

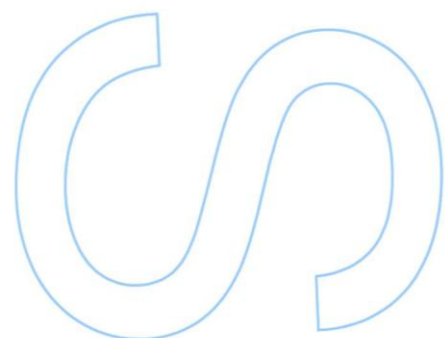
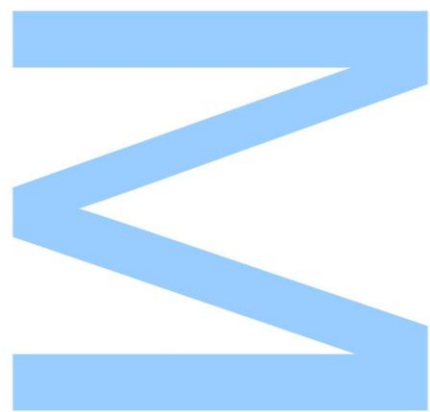


AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO IÓNICA DO MEIO COMO BARREIRA QUÍMICA CONTRA A INVASORA *Artemia franciscana*

Francisco Miguel de Sousa Ferreira
Mestrado em Biologia e Gestão da Qualidade da Água
Departamento de Biologia
2013

Orientadora

Maria da Natividade Ribeiro Vieira
Professora Associada com Agregação
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

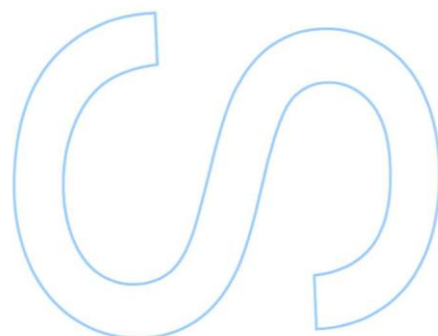
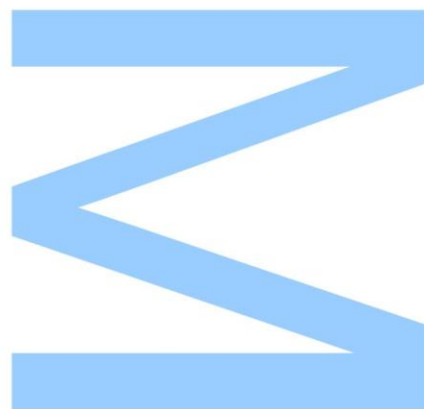




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

A única forma de esta dissertação ficar completa, só poderia ser agradecendo a quem, de alguma forma, me ajudou ou influenciou no percurso percorrido até hoje.

À Professora Doutora Natividade Vieira, expresso o meu mais sincero agradecimento pela oportunidade que me concedeu de, já desde a minha licenciatura, a ter como orientadora. São já alguns anos de amizade, partilha, cooperação e mútua compreensão. Obrigado professora.

Aos Professores Doutores Nuno Formigo e António Paulo Carvalho, agradeço as longas conversas, o apoio prestado e toda a boa disposição com que sempre me receberam.

Agradeço aos percalços que foram aparecendo pelo caminho. Com eles aprendi a lidar melhor com as contrariedades, ultrapassando-os sem lhe dar qualquer valor.

Por fim, agradeço aos que estão sempre em primeiro.

Agradeço a toda a minha família, que, de uma maneira ou de outra, sempre me ajudou na minha vida académica.

Agradeço-te pai, por todo o apoio que sempre me deste. Estiveste sempre ao meu lado quando eu mais precisei, e, tenho a certeza, uma das minhas qualidades aprendi-a contigo: obrigado por me ensinares a ser responsável e organizado.

Obrigado mãe. O teu amor e amizade sempre me ajudaram a ter força para continuar este longo caminho. A minha perspicácia devo-a a ti, mas isso já tu sabes, não é?

Obrigado pais pelo orgulho que sempre mostraram ter. Também eu me sinto orgulhoso...de vos ter como pais.

A ti, irmã, agradeço-te do fundo do coração. Sempre me deste força e conselhos quando mais precisei, mostrando-me sempre o orgulho que tens por mim. Obrigado “*sensata*”.

Ao meu afilhado. Mesmo sendo o membro mais novo da família, consegues sempre arrancar-me um sorriso quando eu mais preciso, e espero, um dia, poder retribuir-te da mesma maneira. Obrigado miúdo.

À Filipa. Porque estás sempre ao meu lado. Acompanhaste-me ao longo de todo este percurso, ajudando-me sempre com o teu amor e carinho, dando-me força para ultrapassar todos os obstáculos. Tu sabes bem o quanto significas para mim. Obrigado por seres que és.

A todos vós, Amigos, dedico este trabalho.

Resumo

A *Artemia* é um pequeno crustáceo que pertence à família *Artemiidae*, à ordem Anostraca e à subclasse Branchiopoda. Neste momento, estão descritas 7 espécies de *Artemia*, 6 bissexuais e uma partenogenética. A sua presença em praticamente todo o mundo é bem representativa da sua alta adaptabilidade e tolerância. A sua distribuição global deve-se também ao facto de conseguir habitar ambientes hipersalinos, pois nestes locais a ocorrência de predadores é reduzida, senão nula.

Atualmente, na Península Ibérica é possível encontrar tanto espécie bissexual *Artemia franciscana*, como a espécie partenogenética.

Em Portugal, apenas existe *Artemia parthenogenetica* como espécie autóctone, no entanto, neste momento está ameaçada de extinção, devido à introdução da espécie invasora, *Artemia franciscana*, que existe em quase todos os biótopos, principalmente no Sul do país.

É então necessário preservar a biodiversidade nos locais onde ainda é possível encontrar a espécie autóctone, e para isso é indispensável conhecer a composição do meio ambiente onde *Artemia* habita.

Assim, este trabalho incide sobre o estudo de uma possível barreira química provocada pela composição iónica da água na salina de Rio Maior, como impeditiva da invasão pela espécie franciscana.

O principal objetivo do trabalho foi determinar quais os efeitos causados pela composição iónica da água na população de *Artemia* autóctone e na população invasora.

Os resultados obtidos demonstram que a composição iónica da água da salina de Rio Maior poderá mesmo atuar como barreira química contra a entrada da espécie invasora, abrindo novas perspetivas de investigação, de forma a tentar perceber melhor o mecanismo do impedimento à invasão.

Palavras-chave: Composição iónica; Barreira química; *Artemia*; Cálcio; Magnésio.

Abstract

The *Artemia* is a small crustacean that belongs to the *Artemiidae* family, Anostraca order, and subclass Branchiopoda. At the moment, there are 7 *Artemia* species described, 6 being bisexual and one parthenogenetic. Its presence all over the world is representative of its high adaptability and tolerance. Its global distribution, is also due to the fact that it can inhabit hyper saline environments, where the occurrence of predators is reduced, or even absent.

Currently, in Iberian Peninsula, it is possible to find both parthenogenetic species and the bisexual species, *Artemia franciscana*.

In Portugal, *Artemia parthenogenetica* is the autochthonous species, however, it is endangered due to the introduction of the invasive species *Artemia franciscana*, which inhabits almost all biotopes, especially in the South.

It is necessary to preserve biodiversity in places where it is still possible to find the autochthonous species, and so, it's imperative to know the medium composition where *Artemia* live.

In order to do that, it is necessary to know the local conditions, especially the conditions of the medium.

This work is focused on the study of a possible chemical barrier caused by the ionic composition of the saline water from Rio Maior saltern, as the major cause preventing the invasion.

The main objective of this work was to determine the effects caused by the ionic composition of the water both in the autochthonous and invasive species of *Artemia*.

The results show that the ionic composition of the water from Rio Maior saltern may work as chemical barrier against the invasive species, opening new perspectives for research, in order to better understand the process preventing the invasion.

Keywords: Ionic composition; Chemical barrier; *Artemia*; Calcium; Magnesium.

Índice

1. Introdução.....	19
1.1. Taxonomia de <i>Artemia</i>	19
1.2. Morfologia e biologia de <i>Artemia</i>	19
1.3. Ecologia de <i>Artemia</i>	24
1.4. Biogeografia de <i>Artemia</i>	26
1.5. Caracterização geral de uma salina	27
1.6. O caso das salinas de Rio Maior	29
1.7. A problemática de <i>Artemia</i> em Portugal	33
1.8. Objetivos deste trabalho de investigação	33
2. Material e Métodos	37
2.1. Locais e periodicidade da amostragem	37
2.2. Parâmetros físico-químicos da água	38
2.3. Populações de <i>Artemia</i>	40
2.4. Manutenção das populações de <i>Artemia</i>	40
2.5. Preparação dos meios a testar	41
2.6. Preparação do alimento	43
2.7. Procedimento experimental	44
2.8. Tratamento estatístico dos dados.....	46
3. Resultados e Discussão.....	49
3.1. Parâmetros físico-químicos da água	49
3.1.1. Profundidade média	49
3.1.2. Temperatura do Ar e da Água.....	50
3.1.3. Alcalinidade	51
3.1.4. pH.....	52
3.1.5. Salinidade	52
3.1.6. Oxigénio dissolvido	54
3.1.7. Sólidos Dissolvidos Totais (S.D.T.)	55

3.1.8. Nitratos	56
3.1.9. Nitritos	57
3.1.10. Fosfatos	57
3.1.11. Amónia	58
3.1.12. Cálcio.....	59
3.1.13. Magnésio	61
3.1.14. Valores medidos em Aveiro	62
3.2. Avaliação do efeito da concentração de cálcio e magnésio.....	63
3.2.1. Estudo intrapopulacional da variação da sobrevivência ao 7º dia	63
3.2.1.1. <i>A.parthenogenetica</i> de Rio Maior	64
3.2.1.2. <i>A.parthenogenetica</i> de Aveiro	65
3.2.1.3. <i>A.franciscana</i>	67
3.2.2. Estudo interpopulacional da variação da sobrevivência ao 7º dia	68
3.2.3. Estudo intrapopulacional da duração máxima atingida.....	74
3.2.3.1. <i>A.parthenogenetica</i> de Rio Maior	75
3.2.3.2. <i>A.parthenogenetica</i> de Aveiro	76
3.2.3.3. <i>A.franciscana</i>	77
3.3. Discussão dos resultados.....	78
4. Conclusão.....	83
Bibliografia.....	87
Anexo I	95

Índice de figuras

Figura 1 - Esquema ventral de uma fêmea adulta de <i>Artemia</i> e detalhe da cabeça de um macho adulto. (Adaptado de Amat, 1985).....	20
Figura 2 - Vista ventral de uma fêmea partenogenética.	20
Figura 3 - Distribuição geográfica de <i>Artemia</i> . (Adaptado de Garcia, 2009).....	26
Figura 4 - Localização da salina de Rio Maior. (Google Earth, Setembro, 2013)	29
Figura 5 - Salinas de Rio Maior. As setas assinalam o percurso da água: é extraída do poço e transferido para os concentradores. Avança pelos concentradores, sendo depois distribuída para toda a salina. (Google Earth, Setembro, 2013)	30
Figura 6 - Aspeto dos concentradores (à esquerda), e dos talhos (à direita).	31
Figura 7 - Aspeto geral dos talhos, durante a época de não produção (à esquerda) e durante a época de produção (à direita).	31
Figura 8 - Aspeto do poço central durante a época de produção.	32
Figura 9 - Esquema da salina de Rio Maior, com indicação dos pontos de amostragem. (Figura de artigo pessoal, ainda em fase de revisão).....	37
Figura 10 - Esquema da salina da Troncalhada (Aveiro). (Adaptado de Rodrigues et al, 2012)	38
Figura 11 - Preparação das soluções a utilizar: do lado esquerdo, o alimento preparado; do lado direito, várias soluções teste já preparadas.....	44
Figura 12 - Esquema da constituição de uma microplaca.	44
Figura 13 - Passo intermédio, onde os nauplios eram lavados na solução a testar. ...	45
Figura 14 - Variação espaço-temporal da profundidade (cm).	49
Figura 15 - Variação espaço-temporal da temperatura da água, e variação temporal da temperatura do ar (°C).	50
Figura 16 - Variação espaço-temporal da alcalinidade (mg/L CaCO ₃).	51
Figura 17 - Variação espaço-temporal do pH.	52
Figura 18 - Variação espaço-temporal da salinidade (g/L).	53
Figura 19 - Variação espaço-temporal do oxigénio dissolvido (mg/L O ₂).	55
Figura 20 - Variação espaço-temporal dos S.D.T. (g/L).	56
Figura 21 - Variação espaço-temporal da concentração de nitratos (mg/L).	57
Figura 22 - Variação espaço-temporal da concentração de fosfatos (mg/L).	58
Figura 23 - Variação espaço-temporal da concentração de amónia (mg/L).	58
Figura 24 - Variação espaço-temporal da concentração de cálcio (mg/L).	60
Figura 25 - Variação espaço-temporal da concentração de magnésio (mg/L).	62
Figura 26 - Influência dos testes na percentagem de sobrevivência da população de <i>A.parthenogenetica</i> de Rio Maior.	65

Figura 27 - Influência dos testes na percentagem de sobrevivência da população de <i>A.parthenogenetica</i> de Aveiro.....	67
Figura 28 - Influência dos testes na percentagem de sobrevivência da população de <i>A.franciscana</i>	68
Figura 29 - Variação da influência do teste 8 nas populações testadas.	69
Figura 30 - Variação da influência do teste 9 nas populações testadas.	70
Figura 31 - Variação da influência do teste 10 nas populações testadas.	70
Figura 32 - Variação da influência do teste 12 nas populações testadas.	71
Figura 33 - Variação da influência do teste 13 nas populações testadas.	72
Figura 34 - Variação da influência do teste 14 nas populações testadas.	72
Figura 35 - Variação da influência do teste 15 nas populações testadas.	73
Figura 36 - Variação da influência do teste 19 nas populações testadas.	73
Figura 37 - Variação da influência do teste 20 nas populações testadas.	74
Figura 38 - Duração máxima atingida pela população de <i>A.parthenogenetica</i> de Rio Maior nos testes efetuados.	75
Figura 39 - Duração máxima atingida pela população de <i>A.parthenogenetica</i> de Aveiro nos testes efetuados.....	76
Figura 40 - Duração máxima atingida pela população de <i>A.franciscana</i> nos testes efetuados.....	77

Índice de tabelas

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos analisados, metodologia de determinação e unidades.	39
Tabela 2 - Concentrações de cálcio e magnésio a testar (mg/L).....	41
Tabela 3 - Constituição da solução base.	42
Tabela 4 - Cálculos a efetuar para determinação de massas a adicionar aos meios a testar.	42
Tabela 5 - Massas a adicionar a cada teste (mg/L).....	43
Tabela 6 - Resumo das sobrevivências observadas ao 7ºdia de experiência, mediante a composição do meio (R.M. - <i>A. parthenogenetica</i> de Rio Maior; Av. – <i>A. parthenogenetica</i> de Aveiro; Af.- <i>A. franciscana</i>)	63
Tabela 7 - Resultado da ANOVA (p) para a população de <i>A.parthenogenetica</i> de Rio Maior.	64
Tabela 8 - Resultado do teste Tukey (p) para a população de Rio Maior, evidenciando entre quais testes a diferença foi significativa.	64
Tabela 9 - Resultado da ANOVA (p) para a população de <i>A.parthenogenetica</i> de Aveiro.	66
Tabela 10 - Resultado do teste Tukey (p) da população de Aveiro evidenciando entre quais testes a diferença foi significativa.	66
Tabela 11 - Resultado da ANOVA (p) para a população de <i>A.franciscana</i>	67
Tabela 12 - Resultado da ANOVA (p) para as três populações testadas.	74
Tabela 13 - Resultados dos testes Tukey (p) evidenciando, em função dos testes, entre quais populações havia percentagens de sobrevivência estatisticamente diferentes.....	95
Tabela 14 - Resultado do teste Tukey (p) evidenciando, para a população de Rio Maior, quais testes influenciavam de forma significativa a duração total de vida.	96
Tabela 15 - Resultado do teste Tukey (p) evidenciando, para a população de Aveiro, quais testes influenciavam de forma significativa a duração total de vida.	96
Tabela 16 - Resultado do teste Tukey (p) evidenciando, para a população de <i>Artemia franciscana</i> , quais testes influenciavam de forma significativa a duração total de vida.	96

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Taxonomia de *Artemia*

Artemia é um género que pertence ao filo *Artropoda* (Siebold e Stannius, 1848), subfilo *Crustacea* (Pennant, 1777), classe *Branchiopoda* (Latreille, 1806), ordem *Anostraca* (Sars, 1867), e família *Artemiidae* (Grochowski, 1896).

A primeira descrição documentada de *Artemia* foi efetuada por Schlösser, em 1756, e refere-se a uma população, atualmente extinta, existente nas salinas de Lymington (Inglaterra). Dois anos mais tarde, em 1758, Linneo viria a denominar esta espécie como *Cancer salinus* (Garcia, 2009; López, 2012). Esta denominação durou até 1919, quando Leach definiu o nome científico *Artemia salina* (Amat, 1985).

Essa denominação ainda hoje dá nome a uma espécie. No entanto, até recentemente, pensava-se que essa era a única espécie presente no género *Artemia* (Hontoria e Amat, 1992). Com o evoluir das técnicas científicas tornou-se mais inequívoco e fácil observar diferenças, quer morfológicas quer genómicas, que permitissem definir novas espécies (Amat *et al*, 2005). Assim, estudos mais recentes ajudaram a comprovar a existência de 6 espécies bissexuais e duas ou três estirpes partenogenéticas (Amat *et al*, 2007). Mesmo com a evolução das técnicas utilizadas, ainda hoje não é completamente consensual que *A. parthenogenetica* deva ser considerada uma só espécie, tendo em conta a grande diversidade encontrada em populações desta espécie, especialmente no que toca à ploidia (Amat *et al*, 2005).

Com o aumento do número de espécies presentes dentro do género *Artemia*, foi necessário que as novas espécies fossem denominadas com nomes binomiais, pelo que, normalmente, o nome científico das espécies refere-se à sua origem geográfica (Amat, 1985). Há, então, atualmente seis espécies bissexuais e uma partenogenética: *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906), *A. persimilis* (Piccinelli e Prosdoci, 1968), *A. salina* (Leach, 1819), *A. urmiana* (Gunther, 1890), *A. sinica* (Cai, 1989), *A. tibetiana* (Abatzopoulos *et al.*, 1998) e *A. parthenogenetica* (Amat *et al*, 2007; López, 2012).

1.2. Morfologia e biologia de *Artemia*

Os indivíduos adultos do género *Artemia* apresentam, de uma forma geral, um corpo segmentado, alongado e delgado, com um tamanho normalmente compreendido entre os 8-10 mm nos machos e 10-12 mm nas fêmeas, sendo que no caso de estirpes de

A. parthenogenetica de elevada ploidia, podem ocorrer indivíduos cujo tamanho chega, podendo mesmo ultrapassar, aos 18 mm. (Amat, 1985; López, 2012)

A coloração dos indivíduos está intrinsecamente ligada às características físico-químicas do meio, nomeadamente à salinidade. *Artemia* apresenta normalmente uma cor alaranjada/avermelhada, podendo também apresentar tons azulados, e no caso de águas com salinidade muito elevada, um tom vermelho muito intenso. (Amat, 1985).

Na fase adulta o corpo divide-se em três partes: cabeça, tórax e abdómen. Estas três partes são claramente diferenciadas, sendo possível observa-las a olho nu (figuras 1 e 2) (Amat, 1985; López, 2012).

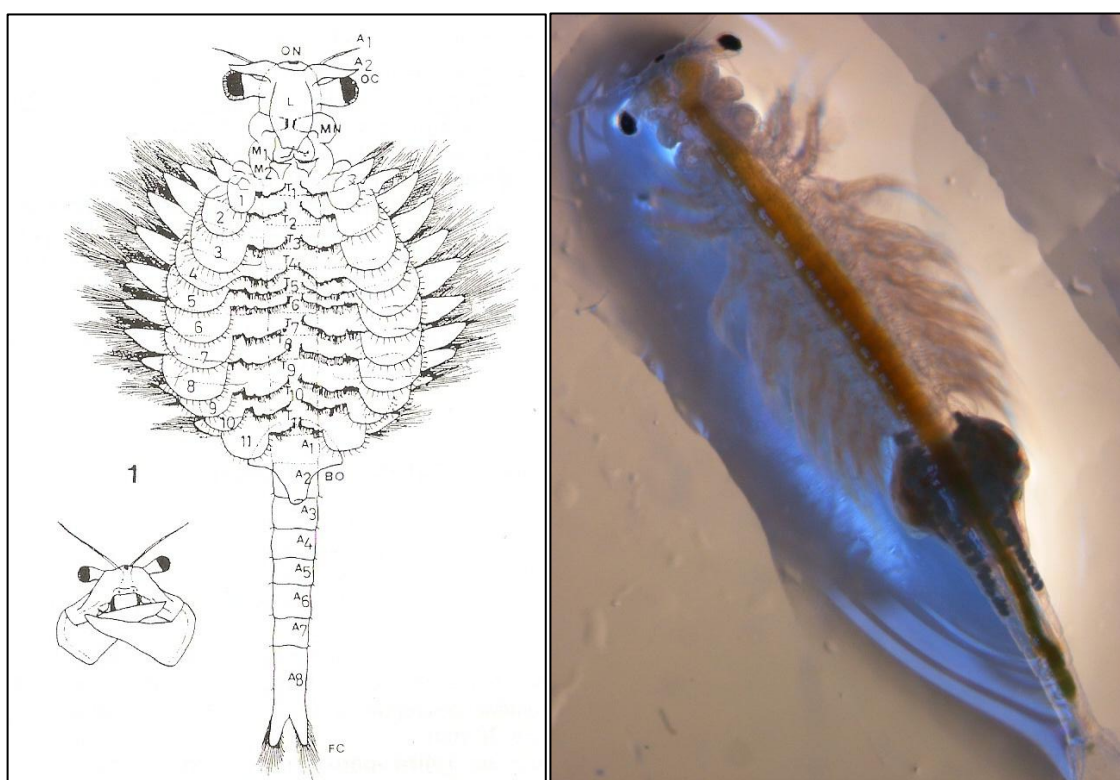


Figura 1 - Esquema ventral de uma fêmea adulta de *Artemia* e detalhe da cabeça de um macho adulto. (Adaptado de Amat, 1985)

Figura 2 - Vista ventral de uma fêmea partenogenética.

A cabeça é composta por cinco segmentos interligados e apenas diferenciáveis pelos apêndices e órgãos que apresentam. Na zona central da cabeça é possível notar, nos adultos, vestígios do olho naupliar, compostos por três ocelos de cor escura. Nos lados da cabeça, nascem dois pedúnculos, que apresentam variações no comprimento consoante a espécie, onde estão os olhos compostos. Estes pedúnculos, além de variarem no comprimento consoante a espécie, variam também em largura, nas espécies bissexuais, sendo mais largos nos machos do que nas fêmeas. Também os olhos apresentam dimorfismo sexual, sendo maiores nos machos do que nas fêmeas

(Amat, 1985; López, 2012). Perto da base dos pedúnculos oculares nascem em posição dorsal as segundas antenas, e em posição mais ventral nascem as primeiras antenas. Também estas antenas são dotadas de dimorfismo sexual, sendo nas fêmeas mais simples e de forma foliar, e nos machos hipertrofiadas, adquirindo uma forma de tenaz (Amat, 1985).

A zona mandibular é composta por um par de mandíbulas, um par de maxilas, e o lábio superior, que cobre as mandíbulas. Entre o lábio superior e as peças bucais encontra-se o átrio bucal, para onde são encaminhadas as partículas encaminhadas ao longo do canal ventral, que são depois encaminhadas para o esófago (Amat, 1985). O tórax está dividido em onze segmentos bem delimitados, existindo em cada um par de apêndices foliáceos chamados toracópodes ou filópodes, com comprimento variável, sendo maiores nos segmentos mais centrais, e menores nos segmentos mais terminais. Estes apêndices são formados por dois tipos de formações distintas: os exopoditos e os endopoditos. Os exopoditos atuam como brânquias e ajudam na osmorregulação ativa, uma vez que têm o tegumento bastante delgado e permeável aos iões, e são compostos por cavidades com hemolinfa, o que permite as trocas gasosas e iónicas com o meio. Os endopoditos têm unicamente a função de filtrar as partículas suspensas no meio e de as encaminhar para o átrio bucal. Assim, estes apêndices, além de deterem um sincronismo excecional, batendo sempre a um ritmo entre 150-200 batimentos por minuto, funcionam como órgãos natatórios, respiratórios, filtradores, e tem função osmorreguladora (Amat, 1985; López, 2012)

O abdómen é composto por oito segmentos, sendo os dois primeiros sexuais e os restantes abdominais. Os segmentos sexuais têm dimensões bastante maiores que os segmentos adjacentes, sendo hipertrofiados na zona mais ventral, onde surgem os órgãos genitais: saco ovífero e útero no caso das fêmeas, e vesícula seminal e pénis no caso dos machos. O diâmetro dos seis segmentos abdominais seguintes diminui de forma sucessiva, sendo que o último segmento corresponde ao télson, onde existe a furca caudal. A furca é uma das formações anatómicas de *Artemia* que mais pode variar, variando entre as espécies, podendo também variar dentro da mesma espécie, consoante as condições do meio, nomeadamente a salinidade, que quando aumenta pode mesmo levar ao desaparecimento da furca (Amat, 1985; López, 2012).

Artemia é um crustáceo evolutivamente muito antigo, apresentando por isso, um sistema nervoso e circulatório bastante rudimentar.

O sistema nervoso é composto por um cérebro rudimentar ligado a uma cadeia ganglionar disposta em posição ventral ao longo de todo o corpo. Ligados à cadeia ganglionar estão um par de gânglios mandibulares, um par de gânglios maxilares, um gânglio labial e vários pares de gânglios genitais (López, 2012).

Como é característico nos crustáceos, o sistema circulatório consiste num sistema lacunar aberto. Este sistema é composto por um coração tubular e por cavidades existentes ao longo do corpo cuja atividade é específica consoante a localização. A hemolinfa presente no sistema circular contém células que são específicas deste género, nomeadamente a hemoglobina Hb₃, que, tendo grande afinidade com o oxigénio, permite às espécies de *Artemia* a adaptação a ambientes com diferentes concentrações de oxigénio (Amat, 1985; López, 2012).

O sistema respiratório está ligado às funções locomotoras, uma vez que os toracópodes, devido à permeabilidade ao oxigénio apresentada e à elevada taxa de batimentos, funcionam como brânquias. Além dos toracópodes, também se crê que o próprio corpo dos indivíduos apresenta permeabilidade ao oxigénio, à água e a outros iões, permitindo então trocas gasosas e a regulação osmótica ativa (Amat, 1985; López, 2012).

Na regulação osmótica, normalmente a pressão osmótica no organismo é mais baixa que no meio, contudo, se a salinidade do meio aumenta, a presença de hemolinfa no organismo também aumenta o que permite um aumento da atividade respiratória e uma troca de água ativa entre o organismo e o meio, levando a uma maior excreção sais. O local por onde é realizada a excreção dos sais varia consoante o estado larvar. Durante a fase larvar, a excreção dos sais é feita pela glândula do sal, enquanto na fase adulta, a excreção é feita nos toracópodes, bem como nas glândulas maxilares e no intestino (Amat, 1985; López, 2012).

O aparelho digestivo é composto por uma boca, seguida de um esófago que está ligado a um intestino que percorre todo o corpo, até à zona caudal, onde se localiza o ânus. Sendo um animal filtrador, a alimentação de *Artemia* baseia-se em material em suspensão no meio, nomeadamente microalgas, bactérias, protozoários e pequenos detritos tanto orgânicos como inorgânicos. O batimento rítmico dos toracópodes encaminha a água para a zona do átrio bucal, de onde o material em suspensão é encaminhado para o esófago. Devido à enorme capacidade que *Artemia* têm de utilizar quase todo o tipo de fontes de nutrientes, como farinha de trigo, farinha de soja, farinha de milho ou até Nestum, considera-se que a alimentação é um processo contínuo e não seletivo (Amat, 1985; López, 2012; Nunes *et al*, 2006).

Na fase naupliar, a nutrição é feita a partir da reserva vitelina, sendo que a partir do estado II, a alimentação passa a ser feita por filtração. No entanto não é um processo tão especializado como no estado adulto, porque a partir do estado II, a filtração é feita apenas com ajuda das anténulas, ficando cada vez mais especializado à medida que o náuplio se desenvolve (Amat, 1985).

A reprodução é um processo que pode ser bissexual, com a presença de machos e fêmeas, ou pode ser partenogenético. O processo reprodutivo é provavelmente uma das características mais impressionantes de *Artemia*: em qualquer dos processos reprodutivos, as fêmeas podem dar origem, de forma individual, a dois tipos de desenvolvimento embrionário: ovovivíparo (náuplios) ou ovíparo (quistos) (Amat, 1985; López, 2012).

O processo reprodutivo inicia-se sempre com os óvulos, que depois de fecundados, no caso das espécies sexuais, podem continuar por um de dois tipos de desenvolvimento: podem desenvolver-se completamente dentro do útero, nascendo já náuplios completamente funcionais, ou podem cessar o desenvolvimento dentro do útero, transformando-se em quistos, completando já fora do útero o desenvolvimento (Amat, 1985; López, 2012).

Os estímulos do meio determinam o tipo de desenvolvimento embrionário (Barata *et al*, 1996). Quando as condições do meio são adversas, a fêmea normalmente provocará o aparecimento de uma estrutura transitória, conhecida como glândula da casca, que segregará uma secreção lipoproteica que envolverá o embrião, dando origem a um quisto de resistência. Assim, os embriões enquistados permanecem num estado de criptobiose, onde o metabolismo é parado, enquanto as condições do meio não forem favoráveis à eclosão do quisto. Quando as condições ambientais se tornam favoráveis, o desenvolvimento é retomado, terminando quando o embrião eclode já em forma de náuplio (Amat, 1985; López, 2012). Os quistos têm sido objeto de inúmeros estudos devido às suas características impressionantes: resistem a enorme amplitude térmica, desde os -271°C até aos 103°C , sem que haja uma grande perda de viabilidade, sendo também resistentes a baixas pressões e a dissolventes orgânicos tais como acetona, éter ou xileno (Amat, 1985).

Durante o estado larvar, os náuplios passam normalmente por dezoito estados larvares. Ao longo dos estados larvares, o tamanho dos náuplios vai aumentando, ocorrendo também o aparecimento e desenvolvimento gradual dos toracópodes e outros apêndices. No final do primeiro estado, os náuplios medem em média $400\text{ }\mu\text{m}$, e como o tubo digestivo ainda não está completamente formado, os náuplios alimentam-se das reservas vitelinas. No final do décimo oitavo estado, os náuplios atingem a fase adulta e podem medir entre 6 e 8mm, dependendo das condições do meio e da espécie (Amat, 1985; López, 2012).

As fêmeas de *Artemia*, depois de atingirem a maturidade sexual, reproduzem-se durante todo o seu ciclo de vida. No caso das espécies bissexuais, a reprodução só é viável quando o macho fertiliza a fêmea. Isso só ocorre quando o macho se coloca por

trás do útero da fêmea, utilizando as primeiras antenas para se fixar a esta, ficando numa posição chamada *riding position* (López, 2012).

1.3. Ecologia de *Artemia*

A temperatura, a salinidade e a alimentação disponível são dos fatores físicos que mais influenciam as populações de *Artemia* nos meios naturais (Browne e Wasigasekera, 2000; López, 2012; Soundarapandian e Saravanakumar, 2009). A co-relação entre estes fatores, nomeadamente entre a salinidade e a temperatura, é bastante complexa, porque a temperatura pode alterar os efeitos da salinidade alterando a tolerância do organismo, e a salinidade pode também alterar os efeitos da temperatura nos organismos (Browne e Wasigasekera, 2000). A temperatura provavelmente será a condição ambiental mais importante no habitat de *Artemia* porque afeta diretamente o metabolismo, o consumo de oxigénio, o crescimento e a sobrevivência (Soundarapandian e Saravanakumar, 2009).

As temperaturas limite toleradas por *Artemia* dependem, geralmente, da espécie e da localização geográfica. *A. tibetiana* é a espécie com maior tolerância à baixa temperatura, havendo registo de várias populações existentes em ecossistemas onde a temperatura média anual varia entre -5°C e 1°C. Apesar disso, é considerado que a temperatura mínima tolerada por *Artemia* ronda os 6°C. A temperatura máxima tolerada por *Artemia* é normalmente atingida nas salinas tropicais, onde se encontram populações em água a cerca de 35°C. No entanto, foi demonstrado que após um certo período de adaptação, *Artemia* proveniente de Macau (Brasil) sobreviveu algumas semanas a temperaturas em redor dos 40°C (Amat, 1985; López, 2012; Persoone e Sorgeloos, 1980). Apesar da grande amplitude térmica, é normalmente considerado que a gama de temperatura ótima para *Artemia* se situa entre os 25°C e os 30°C (Persoone e Sorgeloos, 1980).

Em relação à salinidade do meio, é um pouco difícil definir reais limites de sobrevivência. No que toca ao limite superior são regularmente referidos valores entre 340 g/L e 370 g/L, no entanto, nas populações encontradas nesta gama de valores, os indivíduos apenas sobrevivem, não havendo produção de gerações (López, 2012; Persoone e Sorgeloos, 1980). Em relação aos limites inferiores é complicado definir os valores nos quais é possível encontrar populações no meio natural. Está provado que *Artemia* consegue sobreviver em meios com salinidade em redor dos 3 g/L, no entanto, esta salinidade tão baixa permite o aparecimento de predadores, pelo que, e como *Artemia* não apresenta órgãos de defesa, o limite inferior será tão mais baixo

quanto mais baixo for o limite superior de sobrevivência dos predadores (Amat, 1985; López, 2012; Persoone e Sorgeloos, 1980; Soundarapandian e Saravanakumar, 2009; Van Stappen, 2002). O valor ótimo de salinidade é também difícil de definir, pois, o aumento da salinidade provoca um aumento da energia despendida por *Artemia* para sobreviver, diminuindo assim a energia investida na reprodução (Van Stappen, 2002). Tendo isto em conta, pode-se então considerar que a salinidade ótima para *Artemia* é a salinidade mais baixa disponível no meio, aquando da inexistência de predadores (Persoone e Sorgeloos, 1980).

Em relação ao oxigénio dissolvido, *Artemia* sobrevive a concentrações inferiores a 1ppm ou percentagens de saturação de O₂ superiores a 150% (Amat, 1985). A capacidade de sobreviver a concentrações tão baixas deve-se à existência da hemoglobina Hb₃, um tipo de hemoglobina com elevada afinidade ao oxigénio, que quando a concentração de O₂ no meio baixa, aumenta a concentração na hemolinfa, permitindo uma taxa de respiração constante (López, 2012; Persoone e Sorgeloos, 1980).

A composição iónica do meio tem pouca influência na sobrevivência de *Artemia*, enquanto género, uma vez que é possível encontrar populações de *Artemia* em meios onde o rácio entre os principais aniões e catiões da água são 10 vezes superiores e/ou inferiores ao rácio desses iões na água do mar (Amat, 1985; Bowen et al, 1985; Persoone e Sorgeloos, 1980). No entanto, e apesar de não ser um fator limitante, a composição iónica pode funcionar como barreira química, uma vez que populações ambientadas a uma dada composição iónica terão dificuldades em sobreviver quando são colocadas num meio cuja composição iónica difere da do meio do qual essas populações são provenientes (Bowen et al, 1985; Bowen et al, 1988). Também em relação aos valores de magnésio e cálcio na água, *Artemia* apresenta elevada plasticidade, sobrevivendo a gamas de concentrações de magnésio entre 0g/L e 16g/L, e a gamas de concentrações de cálcio entre 0g/L e 4,5g/L (Bowen et al, 1988). Apesar de *Artemia* demonstrar grande plasticidade no que toca à sobrevivência a diferentes composições iónicas no meio, a composição iónica é também um dos principais meios de especiação e isolamento entre as populações deste género (Amat, 1985; Bowen et al, 1985; Bowen et al, 1988; Persoone e Sorgeloos, 1980).

Como já foi referido, *Artemia* é um animal filtrador, pelo que filtra todo o material dissolvido em suspensão que tenha um tamanho máximo de 50µm (Amat, 1985; López, 2012; Persoone e Sorgeloos, 1980). Normalmente a sua alimentação baseia-se em detritos orgânicos, microalgas, halobactérias, e outros microrganismos que surjam nos ambientes hipersalinos (Amat, 1985). A densidade das populações de *Artemia*, é,

normalmente, tanto maior quanto maior for a disponibilidade de alimento no meio (Persoone e Sorgeloos, 1980).

1.4. Biogeografia de *Artemia*

A elevada tolerância de *Artemia* às condições do meio faz com que populações deste género sejam encontradas um pouco por todo o mundo, com exceção do continente Antártico (figura 3) (Garcia, 2009).

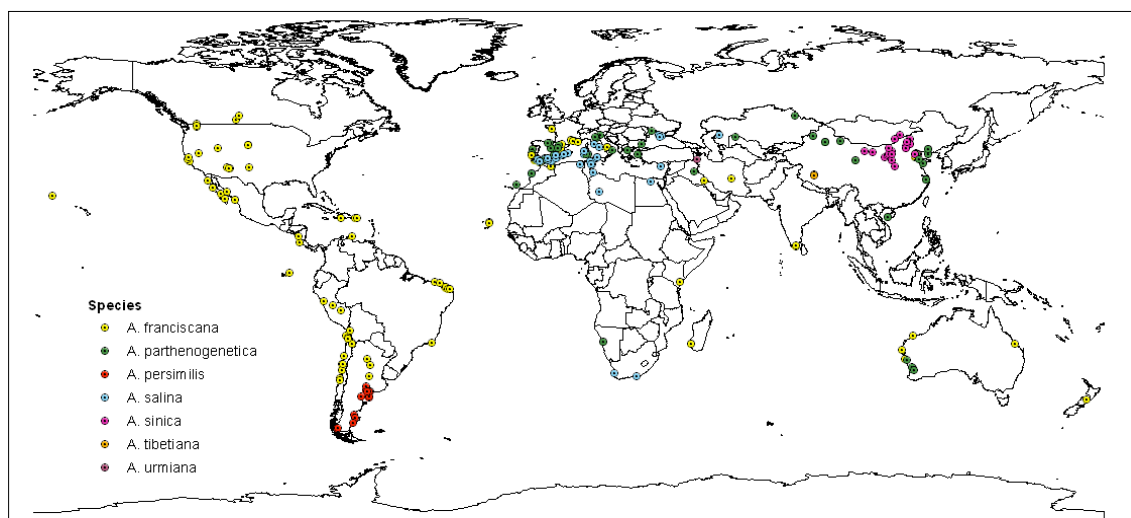


Figura 3 - Distribuição geográfica de *Artemia*. (Adaptado de Garcia, 2009)

A. franciscana é originária do continente Americano, estando distribuída ao longo de todo o continente. No entanto, devido à sua comercialização e introdução intencional em salinas, neste momento encontra-se também distribuída um pouco por todo o mundo, incluindo Portugal (Amat, 1985; Amat *et al*, 2007; López, 2012)

A. persimilis é também originária do continente Americano, limitando-se a sua existência quase na totalidade à parte mais a sul da América do Sul. (Amat *et al*, 2004; Amat *et al*, 2007).

Na Bacia do Mediterrâneo ocorrem juntamente *A. salina* e duas estirpes partenogenéticas (diploide e tetraploide) de *A. parthenogenetica*. Apesar de diferentes, a ocorrência destas duas espécies no mesmo local é possível, pois as espécies nunca ocorrem em simultâneo, ocorrendo então de forma alternada durante o ano (Amat *et al*, 2007; Hontoria e Amat, 1992).

A. urmiana está presente exclusivamente do continente asiático, no lago Urmia. Também no continente asiático, mais concretamente na China, é possível encontrar *A.*

sinica, ocorrendo ainda *A. tibetiana* nos lagos salgados no Tibete (Amat *et al*, 2007; López, 2012).

As populações partenogenéticas de *Artemia* são normalmente encontradas na região do mediterrâneo, em África, Ásia e Austrália (López, 2012).

Pode dizer-se que devido à sua adaptabilidade, as espécies de *Artemia* podem ser encontradas em todo o tipo de biótopos, desde zonas tropicais a subtropicais ou temperadas. No entanto a sua dispersão não se limita às zonas costeiras, sendo possível encontrar estas espécies em lagos interiores hipersalinos. Esta ampla distribuição, apesar dos indivíduos normalmente nunca saírem do seu biótopo, deve-se muito em parte à dispersão dos quistos, que devido à elevada resistência que têm podem ser transportados passivamente para fora dos seus habitats, e também à introdução voluntária pelo Homem (Amat, 1985).

1.5. Caracterização geral de uma salina

Como é sabido, na antiguidade não havia meios de conservar as carnes em frio e com a descoberta das propriedades de conserva do sal, este passou a ter uma importância de relevo no panorama global (Silva, 1988). Já no tempo dos Romanos o sal tinha elevada importância, ao ponto de ter sido a primeira forma de pagamento utilizada por esse povo, e daí advir a palavra salário, cujo significado é “pagamento feito com sal” (Silva, 1988).

Cerca de um terço do sal produzido mundialmente é proveniente de salinas solares, através da evaporação de água do mar ou de água proveniente de fontes salinas (Davis, 2000; Davis e Giordano, 1996).

De uma forma geral, o processo de produção de sal numa salina baseia-se no encaminhamento da água salgada através de tanques, cuja profundidade vai reduzindo de uns para os outros, onde a água é retida algum tempo de forma a aumentar a sua salinidade devido à evaporação causada pelo sol e vento. A salinidade, devido à evaporação, aumenta de tal forma, que os sais começam a precipitar, depositando-se no fundo dos tanques (Davis, 2000; Davis e Giordano, 1996; Korovessis e Lekkas, 2009). Os primeiros sais a precipitar são o carbonato de cálcio e o sulfato de cálcio, respetivamente, depositando no fundo dos tanques, sendo que a salmoura é apenas transferida para os tanques finais, quando a concentração de cloreto de sódio está perto do limite de saturação (Davis, 2000).

Já nos últimos tanques, a concentração aumenta de tal forma, começando os sais de cloreto de sódio a precipitar, quando a concentração dos mesmos atinge cerca de

250g/L, ficando o sobrenadante rico em magnésio, potássio e sulfato, sendo este sobrenadante posteriormente removido (Davis e Giordano, 1996). De forma a se conseguir obter o cloreto de sódio mais puro possível, todos estes processos devem ser feitos quando a água atinge as concentrações corretas, e isso é fácil de concretizar com a ajuda dos aparelhos e utensílios hoje em dia disponíveis, no entanto, há que salientar e valorizar muito a sabedoria popular, que já desde há muito tempo, sem auxílio de aparelhos de medição, sempre foi capaz de proceder à correta exploração do sal.

A composição da água que entra nas salinas varia muito consoante a origem da água: nas salinas costeiras normalmente é utilizada água do mar, enquanto nas salinas interiores a água é, normalmente, originária de fontes que atravessam algum maciço rochoso de sal-gema (Calado e Brandão, 2009; Davis, 2000; Ecosal-atlantis 2011; Gajardo *et al*, 2006; Pinto *et al*, 2012; Walmsley, 1999).

No caso das salinas que utilizam água do mar, a composição iónica da água, à entrada da salina, será semelhante à composição da água em alto mar, onde 78% dos sais dissolvidos na água correspondem a cloreto de sódio, sendo o restante correspondente a cloretos e sulfatos diversos como cloreto de potássio e magnésio e sulfato de cálcio e magnésio (Baseggio, 1973; Silva, 1988). Uma vez que ao longo do percurso na salina a concentração dos sais aumenta, é normal que a concentração de magnésio e cálcio também aumente. No momento em que a água entra para as salinas a concentração de cálcio é cerca de 0,5g/L e do magnésio cerca de 1,3g/L. Quando a concentração da água chega aos níveis em que o sulfato de cálcio começa a precipitar, a concentração de cálcio é máxima, atingindo cerca de 1,5g/L enquanto o magnésio tem já uma concentração de 4,7g/L. No entanto, depois de o sulfato de cálcio precipitar e de a água atingir concentrações altas o suficiente para precipitar o cloreto de sódio, o cálcio está presente numa concentração mais reduzida, 0,4g/L, devido à anterior precipitação do sulfato de cálcio. Já o magnésio, no momento em que o cloreto de sódio começa a precipitar, pode atingir concentrações em redor dos 13g/L (Baseggio, 1973).

Em relação às salinas interiores, a sua composição iónica é, normalmente, menos diversa que a da água do mar (Calado e Brandão, 2009), variando com a localização da salina, sendo ainda muito mais concentrada: um litro de água do mar contém cerca de 38,5 gramas de sais, enquanto um litro de água de um poço de uma salina interior pode atingir concentrações iniciais de 220 gramas de sais por litro (Silva, 1988). Há também diferenças ao nível de proporções iónicas, uma vez que 96% dos sais dissolvidos correspondem a cloreto de sódio (Silva, 1988), verificando-se ainda que a

concentração inicial de magnésio é bastante mais baixa que na água do mar: cerca de 0,1g/L (Calado e Brandão, 2009).

1.6. O caso das salinas de Rio Maior

Este tipo de salinas, além do natural interesse suscitado pelo aparecimento de água salgada num poço, tem um importante relevo a nível nacional por serem atualmente as únicas salinas interiores em funcionamento em Portugal (Calado e Brandão, 2009).

Estas salinas, também chamadas de marinhas, localizam-se a cerca de 3km da cidade de Rio Maior e a cerca de 30km do Oceano Atlântico (39°21'49.90"N; 8°56' 38.93"W) (figura 4), o que aumenta o interesse e curiosidade no aparecimento de água salgada no poço (Calado e Brandão, 2009).



Figura 4 - Localização da salina de Rio Maior. (Google Earth, Setembro, 2013)

O aparecimento de água salgada nestas salinas é devido à existência de um maciço de sal-gema no solo abaixo das salinas (Calado e Brandão, 2009; Silva, 1988). O aparecimento desse maciço de sal-gema remonta ao período Triássico, durante o qual a atual Europa ainda não se tinha formado, existindo apenas um vasto deserto com lagoas (Silva, 1988). O afastamento das placas europeia e norte-americana, aliado à exposição a um clima quente durante cerca de 20 milhões de anos, fez com que as lagoas fossem evaporando deixando maciços de sal-gema de grandes dimensões, que ao longo do tempo, com os avanços e recuos do oceano, acabaram por ficar cobertas por sedimentos (Silva, 1988).

Estudos geológicos mostram que o maciço de sal-gema que alimenta as salinas de Rio Maior tem cerca de 270m de espessura e encontra-se a 70 metros de

profundidade (Calado e Brandão, 2009). Por se situarem num vale composto por maciços de calcário, as salinas de Rio Maior são alimentadas pela água das chuvas que se infiltra e lixivia o maciço de sal-gema, tornando-se em água salgada, acabando por ser captada no poço central das salinas (Calado e Brandão, 2009). No que toca à alimentação do poço central, a literatura não é completamente unânime no que se refere à origem da água: de acordo com Nuno Silva (1988), a água no poço pode surgir de três nascentes que atravessam três filões de sal-gema diferentes: uma de onde a água é quase doce, outra onde tem salinidade moderada, e outra onde a salinidade é muito elevada. Apesar disso, toda a literatura encontrada é concordante nos valores de salinidade e composição química do sal e água (Calado e Brandão, 2009; Ecosal-atlantis, 2011; Goucha *et al*, 1977; Silva, 1988)

Atualmente as salinas (figura 5) ocupam uma área de cerca de 27000m², na qual existem cerca de 470 “compartimentos” (Calado e Brandão, 2009; Ecosal-atlantis, 2011; Silva, 1988), sendo que cerca de 5000m² são ocupados por concentradores (figura 6).



Figura 5 - Salinas de Rio Maior. As setas assinalam o percurso da água: é extraída do poço e transferido para os concentradores. Avança pelos concentradores, sendo depois distribuída para toda a salina. (Google Earth, Setembro, 2013)



Figura 6 - Aspeto dos concentradores (à esquerda), e dos talhos (à direita).

Esses compartimentos têm diferentes nomes consoante a sua função: cerca de 400 são designados talhos (figura 7), tem entre 35 a 50m² (Calado e Brandão, 2009) e é onde a água é deixada a evaporar, e cerca de 70 são chamados esgoteiros ou concentradores, que são parecidos com os talhos, mas de maior profundidade para armazenar água salgada que depois reabastece os talhos (Ecosal-atlantis, 2011).



Figura 7 - Aspeto geral dos talhos, durante a época de não produção (à esquerda) e durante a época de produção (à direita).

Todos os talhos e esgoteiros são alimentados a partir de um só poço central, o qual tem cerca de 9 metros de profundidade e um diâmetro de 3,75 metros (figura 8) (Calado e Brandão, 2009, Ecosal-atlantis, 2011; Silva, 1988).

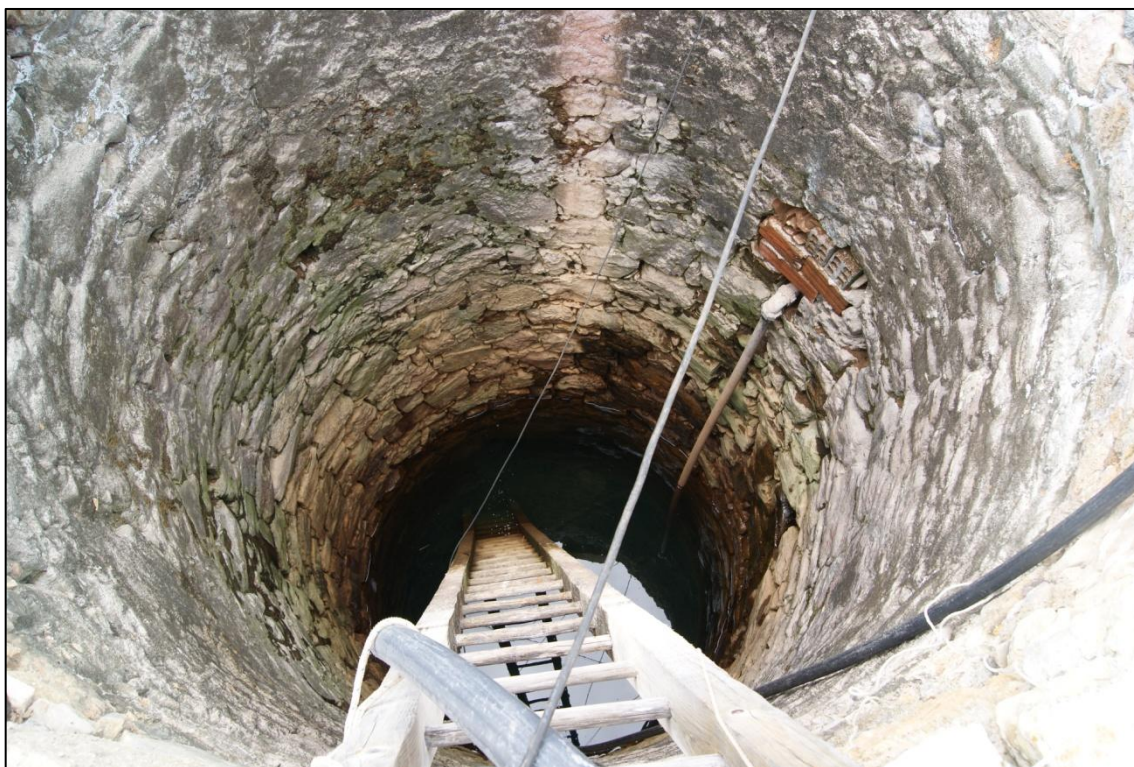


Figura 8 - Aspeto do poço central durante a época de produção.

A água retirada do poço central tem uma mineralização total bastante elevada, cerca de 220g/l, dos quais 213 gramas são só de cloreto de sódio, ou seja, a água que abastece as salinas de Rio Maior é constituída por cloreto de sódio quase puro (Goucha *et al*, 1977).

Aliada a esta elevada concentração de cloreto de sódio, está a baixa concentração de magnésio, o que torna o sal desta salinas muito mais puro e seco que o sal das salinas convencionais (Goucha *et al*, 1977). Devido a essa elevada mineralização a produtividade destas salinas é bastante elevada em comparação com as salinas convencionais, uma vez que por um litro de água produz quase sete vezes mais sal (Ecosal, 2011; Goucha *et al*, 1977; Silva, 1988).

Um elemento de habitual curiosidade por quem visita estas salinas, reside no facto de, quer os artefactos, quer as casas em redor das salinas, serem construídos quase exclusivamente em madeira (Goucha *et al*, 1977). Aliás, devido ao engenho dos marinheiros, nas casas em redor das salinas, que eram antigos armazéns do sal, até as fechaduras e chaves são de madeira para evitar que se tornassem em blocos de ferrugem (Silva, 1988).

1.7. A problemática de *Artemia* em Portugal

Em Portugal, a redução dos ambientes hipersalinos nos últimos 20 anos situa-se na ordem dos 55%, sendo que a maioria corresponde a salinas solares (Amat *et al*, 2007).

O aparecimento de *A. franciscana* nos ambientes hipersalinos de Portugal deveu-se a um ato intencional, feito por aquicultores, em cerca de 1980, na zona sul de Portugal. Daí, originou-se uma invasão, de sul para norte, atingindo salinas localizadas um pouco por todo o país, alcançando as salinas de Aveiro por volta de 1990. Além desta invasão a nível local, o facto de Portugal se situar numa zona por onde atravessam várias rotas migratórias de aves possibilitou ainda mais a dispersão da espécie invasora, nomeadamente através de quistos (Amat *et al*, 2005; Amat *et al*, 2007)

Assim, neste momento, *A. franciscana* está presente em quase todas as salinas de Portugal, mesmo no Norte do país (Salinas Esmolas, Aveiro, entretanto desativadas), exceto em dois locais: as salinas de Rio Maior (39°21'49.90"N; 8°56' 38.93"W), e nalgumas salinas de Aveiro, nomeadamente na da Troncalhada e Senitra (40°38'37"N 8°39'57"W) (Amat *et al*, 2007, Pinto *et al*, 2012).

1.8. Objetivos deste trabalho de investigação

Os objetivos deste trabalho foram traçados tendo em conta a distribuição atual da invasora *A. franciscana*, no que toca a locais ainda não invadidos em Portugal, nomeadamente a salina de Rio Maior (39°21'49.90"N; 8°56' 38.93"W).

Foram já realizados alguns estudos com a intenção de perceber se há alguma característica particular nas salinas portuguesas não invadidas que impeça a propagação da espécie invasora. No entanto, não foi ainda possível definir se há algum motivo em particular para que tal não ocorra (Pinto *et al*, 2012).

Assim, e tendo em conta as publicações de Bowen *et al* de 1985 e 1988, foi colocada a hipótese de a constituição iónica da água desta salina em particular ter propriedades que não sejam favoráveis à sobrevivência de *A. franciscana*, particularmente no que toca às baixas concentrações cálcio encontradas na salina, uma vez que o cálcio é um mineral essencial para os crustáceos, nomeadamente no que toca à segregação do seu exosqueleto, e às concentrações de magnésio, por serem bastante mais reduzidas que a concentração de magnésio normalmente presente na água do mar.

Inicialmente este trabalho foi projetado também com o objetivo de relacionar a distribuição de *Artemia* na salina de Rio Maior com as características físico-químicas da água. No entanto, por motivos logísticos e financeiros o objetivo foi ajustado. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de perceber o efeito que os baixos níveis de cálcio e magnésio encontrados na salina de Rio Maior têm sobre a sobrevivência de *A. franciscana*, para perceber se as concentrações desses iões podem estar a funcionar como barreira impedindo a invasão.

Numa fase já mais adiantada do trabalho, e uma vez que existe também uma salina em Aveiro que não foi ainda invadida por *A. franciscana*, optou-se por expor também a população de *A. parthenogenetica* de Aveiro aos níveis de cálcio e magnésio testados.

MATERIAL E MÉTODOS

2. Material e Métodos

2.1. Locais e periodicidade da amostragem

As colheitas foram realizadas na salina interior de Rio Maior ($39^{\circ}21'49.90''\text{N}$; $8^{\circ}56'38.93''\text{W}$), ao longo do percurso que a água percorre desde a extração do poço até à produção de sal. Assim, foram determinados três locais de amostragem: à saída do poço (1), um concentrador (2) e um talho (3) (figura 9). No esquema apresentado é possível também localizar o poço (P) de onde a água é extraída.



Figura 9 - Esquema da salina de Rio Maior, com indicação dos pontos de amostragem. (Figura de artigo pessoal, ainda em fase de revisão)

A escolha dos locais foi determinada pela logística envolvente: não sendo possível recolher água diretamente do poço, essa amostra foi recolhida no local de armazenamento de água logo a seguir à saída do poço. Uma vez que esse local correspondia já aos concentradores, foi então recolhida água do primeiro concentrador (para corresponder à água do poço) e do último concentrador, para corresponder à amostra do concentrador. O talho escolhido teve como critério o estado de funcionamento do talho, uma vez que os talhos abandonados não se apresentavam em boas condições de construção. Não havendo necessidade de monitorizar a qualidade da água nos locais de amostragem e por motivos logísticos, financeiros e sazonais determinou-se que apenas seriam feitas colheitas sazonais. Apesar disso, apenas foram feitas três colheitas (Junho/2012; Setembro/2012; Maio/2013) uma vez

que durante o Inverno e parte da Primavera a salina de Rio Maior se encontrava inundada.

Em relação à amostragem na salina da Troncalhada (40°38'37"N8°39'57"W) (Aveiro), só foi efetuada uma colheita pois a decisão de incluir esses dados no trabalho foi decidida após conhecer os resultados dos testes efetuados às populações de *Artemia*. Apenas foi efetuada uma colheita em Setembro de 2013. Os locais amostrados seguiram o padrão utilizado em Rio Maior, onde foi recolhida uma amostra de cada local pertencente ao percurso da água (Vieira, 1989; Rodrigues *et al.*, 2012). Assim, foram recolhidas amostras do canal de abastecimento (1), de um tanque evaporador (2), de um tanque concentrador (3) e de um tanque cristalizador (4) (figura 10).

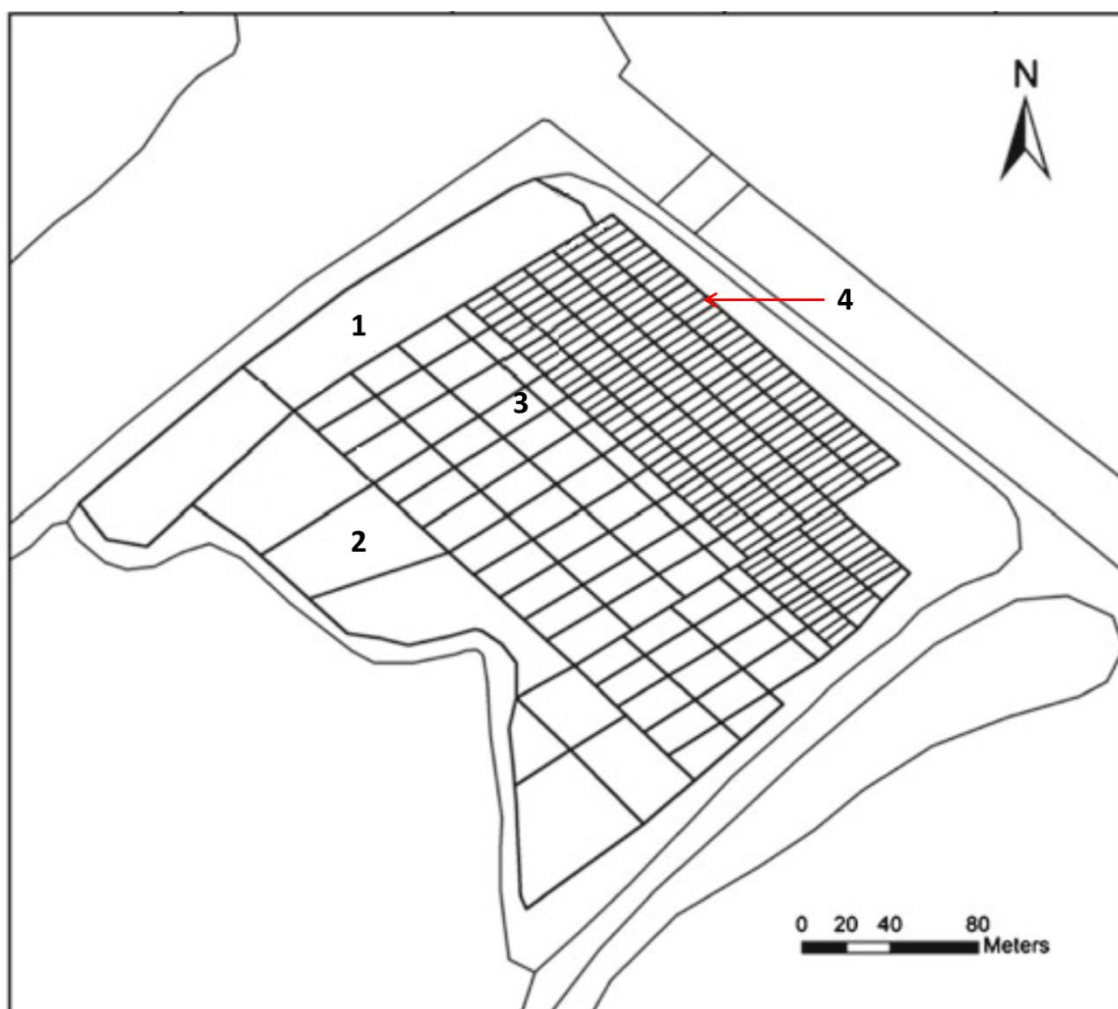


Figura 10 - Esquema da salina da Troncalhada (Aveiro) (Adaptado de Rodrigues *et al.*, 2012).

2.2. Parâmetros físico-químicos da água

As características físico-químicas da água têm impacto na diversidade e produtividade dos sistemas biológicos. Assim, e uma vez que as salinas de onde são provenientes as populações autóctones utilizadas nesta experiência poderão estar sujeitas a

diversos *inputs* poluentes, nomeadamente provenientes da agricultura, foram determinadas algumas características físico-químicas da água dos locais de amostragem de forma a despistar possíveis picos de nutrientes. Uma vez que o objetivo deste trabalho não passa pela análise à qualidade da água, a determinação das características físico-químicas não foi feita com interesse qualitativo mas sim quantitativo, por forma a determinar quais os valores dos iões metálicos encontrados nas salinas. Então, a escolha dos parâmetros a determinar (tabela 1) teve em conta a sua relevância para os objetivos do trabalho, a disponibilidade logística e o custo associado aos mesmos.

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos analisados, metodologia de determinação e unidades.

	Parâmetro	Determinação	Unidades
Parâmetros determinados <i>in situ</i>	Temperatura da água	Sonda HI 98129 (Combo pH e EC) da Hanna Instruments.	°C
	Temperatura do ar		°C
	pH		Escala de Sorensen
	Sólidos dissolvidos totais (SDT)		ppm
	Profundidade	Régua graduada.	cm
	Alcalinidade	Fotómetro portátil HI 755 da Hanna Instruments	ppm
	Oxigénio dissolvido (O ₂)	Sonda HI 9142 da Hanna Instruments.	mg O ₂ /l
Parâmetros determinados em laboratório	Nitritos (NO ₂ ⁻)	Fotómetro Multiparamétrico de Bancada, da série C-200 da Hanna Instruments.	mg/l NO ₂ ⁻
	Nitratos (NO ₃ ⁻)		mg/l NO ₃ ⁻
	Amoníaco (NH ₃)		mg/l NH ₃
	Fosfato (PO ₄ ³⁻)		mg/l PO ₄ ³⁻
	Cálcio (Ca)		mg/l Ca
	Magnésio (Mg)		mg/l Mg

A determinação do oxigénio dissolvido, temperatura da água e do ar, pH, sólidos dissolvidos totais e alcalinidade foi realizada *in situ*. A determinação dos nutrientes e dos iões metálicos (magnésio e cálcio) foi realizada em laboratório. Para isso foram colhidas três réplicas em frascos de polietileno de 250ml em cada local de amostragem. Depois de recolhidas, as amostras foram etiquetadas e transportadas para laboratório numa caixa térmica, a fim de realizar em laboratório a quantificação dos nutrientes e iões metálicos.

2.3. Populações de *Artemia*

Este trabalho foi realizado utilizando duas populações autóctones de *Artemia parthenogenetica* diploide (Pinto *et al*, 2012) e uma população de *Artemia franciscana*. As populações autóctones foram obtidas através da captura *in situ* na salina interior de Rio Maior (39°21'49.90"N; 8°56' 38.93"W) e na salina da Troncalhada (Aveiro) (40°38'37"N8°39'57"W), utilizando uma rede de zooplâncton (160µm). Estas populações foram inicialmente capturadas para a realização de outros trabalhos, mas, acabaram por ser mantidas, de forma a obter e conservar quistos para posteriormente dar início às experiências a partir das mesmas condições. A população de *Artemia franciscana* utilizada é proveniente de uma embalagem comercial de quistos (Ocean Nutrition™, Great Salt Lake).

2.4. Manutenção das populações de *Artemia*

As populações autóctones foram mantidas em gobelés de 2000ml, com água do mar (35±1ppm) filtrada, com aeração constante, embora de fluxo reduzido, sem fotoperíodo controlado (estavam sujeitas ao fotoperíodo natural) e em banho-maria a 24±0°C. A cada dois dias, recorrendo a uma rede de 160µm de malha, o meio era renovado e os quistos existentes eram recolhidos e conservados em salmoura. Aquando da renovação do meio, as populações eram também alimentadas utilizando *Tetraselmis suecica* cultivada em laboratório.

O cultivo de *Tetraselmis suecica* em laboratório foi realizado utilizando balões de vidro de 6L, nos quais eram esterilizados em autoclave 5L de água do mar (35±1ppm), a qual era depois enriquecida utilizando meio de cultura Fabregas, numa proporção de 1:100. O meio de cultura era preparado em laboratório, seguindo as instruções em Fabregas *et al*, 1984. Depois de enriquecida a água do mar, era efetuada uma repicagem de *Tetraselmis suecica* para o novo balão, ficando depois em crescimento à temperatura ambiente, com luminosidade e aeração constante.

Uma vez que não era objetivo do trabalho avaliar a influência do regime alimentar, este não era controlado rigorosamente, sendo apenas controlada, recorrendo a microscópio, a existência de organismos contaminantes na cultura de *Tetraselmis suecica*.

Como referido anteriormente, aquando da mudança do meio, era adicionada *Tetraselmis suecica*, numa proporção que variava entre 1:4 e 1:2 (mediante a

densidade da microalga, que era avaliada visualmente), ao meio onde as populações de *Artemia* eram mantidas.

Sempre que havia quistos nas maternidades (gobelés com as populações de *Artemia*) aquando da sua manutenção, estes eram recolhidos, procedendo à sua desidratação e seleção por densidade, através da colocação em salmoura, uma vez que os quistos inviáveis depositavam. Os quistos colocados em salmoura eram, ao fim de um mês, lavados com água destilada e postos a secar à temperatura ambiente, para garantir que os quistos ficavam em bom estado de conservação para posterior utilização.

2.5. Preparação dos meios a testar

Uma vez que o objetivo do trabalho era averiguar o efeito das concentrações de cálcio e magnésio nas três populações de *Artemia*, todas as soluções a testar foram preparadas utilizando como solvente água destilada, pois só assim se poderia garantir a inexistência tanto de cálcio como de magnésio nas soluções.

A seleção dos valores a testar não seguiu nenhum padrão ou fator de multiplicação/adição, uma vez que o objetivo do trabalho não era a determinação da toxicidade dos iões metálicos. Assim, os valores escolhidos tiveram como base de seleção os valores mínimos, intermédios e máximos encontrados nas salinas, além do fator logístico, uma vez que por cada valor extra a testar, seriam necessárias, no mínimo, mais 12 microplacas (4 para cada população). Tendo em conta tudo isto, e que foram testadas as concentrações de forma isolada e combinada, foi determinado um total de 20 testes por população (tabela 2). Todas as soluções testadas foram preparadas a partir de uma solução base, à qual seria necessário adicionar magnésio ou cálcio, consoante a condição a testar.

Tabela 2 - Concentrações de cálcio e magnésio a testar (mg/L)

# Teste	[Ca]	[Mg]	# Teste	[Ca]	[Mg]
1	0	0	11	150	0
2	0	50	12	150	50
3	0	100	13	150	100
4	0	450	14	150	450
5	0	1300	15	150	1300
6	50	0	16	450	0
7	50	50	17	450	50
8	50	100	18	450	100
9	50	450	19	450	450
10	50	1300	20	450	1300

A solução base foi preparada tendo em conta o trabalho realizado por Bowen *et al*, 1988. Apesar das concentrações dos reagentes utilizados por Bowen *et al* estarem bem detalhadas, neste trabalho esses valores não foram fielmente replicados, nomeadamente no que respeita à concentração de cloreto de sódio e aos reagentes utilizados para adicionar magnésio e cálcio. Assim, todas as soluções utilizadas partiram de uma solução base (Tabela 3).

Tabela 3 - Constituição da solução base.

Reagente	Concentração (g/L)
Cloreto de sódio (NaCl)	35
Sulfato de Sódio (Na ₂ SO ₄)	31
Borato de Sódio (Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O)	1
Sulfato de Potássio (K ₂ SO ₄)	0,866

Na preparação das soluções específicas, foi utilizado CaCl₂·2H₂O (Cloreto de cálcio) para acertar a concentração de cálcio e MgCl₂ (cloreto de magnésio) para acertar a concentração de magnésio. Apesar de haver outros reagentes com cálcio e magnésio na sua constituição, os reagentes utilizados foram escolhidos pelo facto de os elementos extra magnésio ou cálcio não serem estranhos ao meio.

Foram, inicialmente, preparados 11L de solução base, sendo depois preparados 20 frascos de 500ml, cada um correspondendo a uma solução a testar. A solução base foi também utilizada para preparar o alimento a utilizar, conforme será explicado mais adiante.

Foram preparados frascos com 500ml de solução definitiva para cada condição a testar, pois eram necessários 216ml para iniciar as experiências das três populações, e o que sobrava da solução era dividido por cada população para ser utilizado, como à frente será explicado, para lavar os náuplios.

Foram efetuados cálculos (tabela 4) recorrendo à massa molar de cada reagente, para determinar qual a massa dos reagentes a adicionar (tabela 5).

Tabela 4 - Cálculos a efetuar para determinação de massas a adicionar aos meios a testar.

Dados necessários ao cálculo		
$v = 0,5l$ $[Ca] = x \text{ g/l}$ $[Mg] = y \text{ g/l}$	Cálculo do número de moles a adicionar	Conversão do número de moles em massa a adicionar.
$M(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 147,2\text{g/mol}$ $M(\text{Ca}) = 40,07 \text{ g/mol}$	$\frac{x[Ca]}{M(Ca)} = \text{mol}(Ca)$	$m(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = \text{mol}(Ca) * M(\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$
$M(\text{MgCl}_2) = 203,3\text{g/mol}$ $M(\text{Mg}) = 24,31 \text{ g/mol}$	$\frac{y[Mg]}{M(Mg)} = \text{mol}(Mg)$	$m(\text{MgCl}_2) = \text{mol}(Mg) * M(\text{MgCl}_2)$

De referir que todo o material utilizado na preparação dos meios a testar foi previamente lavado utilizando ácido nítrico a 20%, de forma a eliminar quaisquer contaminantes que pudessem influenciar os testes.

Tabela 5 - Massas a adicionar a cada teste (mg/L).

# Teste	CaCl ₂	MgCl ₂	# Teste	CaCl ₂	MgCl ₂
1	0	0	11	276	0
2	0	210	12	276	210
3	0	418	13	276	418
4	0	1880	14	276	1880
5	0	5440	15	276	5440
6	92	0	16	827	0
7	92	210	17	827	210
8	92	418	18	827	418
9	92	1880	19	827	1880
10	92	5440	20	827	5440

2.6. Preparação do alimento

Uma vez que algumas das soluções a testar tinham valores de magnésio e cálcio muito baixos ou nulos, a alimentação fornecida aos náuplios durante as experiências não podia consistir em *Tetraselmis suecica*. A solução surgiu no trabalho realizado por Bowen *et al*, onde a alimentação consistia em leveduras.

O alimento foi preparado diluindo 17g de fermento vivo de padreiro (marca Lallemand) e 4g de pó de leveduras de cerveja (marca Condi) em 90ml do meio a testar (figura 11).

Segundo Bowen *et al*, durante a experiência alimentaram três vezes cada população testada, adicionando 50µl de alimento a cada recipiente. Segundo eles, no final da experiência, com este regime alimentar terão adicionado ao meio menos de 3mg de cálcio e menos de 30mg de magnésio. Nas experiências deste trabalho, além de se adicionar apenas 40µl de alimento, nas medições efetuadas ao alimento não foram detetados quaisquer valores de magnésio ou cálcio. No entanto é necessário ter em conta a precisão do fotómetro, uma vez que para o cálcio, a precisão é de $\pm 0,11$ mg/L e o desvio típico é 0,01mg/L e para o magnésio a precisão é de $\pm 0,01$ mg/L e o desvio típico é $\pm 0,02$ mg/L. Ainda assim, para reduzir o possível incremento de magnésio e/ou cálcio nos testes, o alimento foi preparado utilizando como solvente a solução base preparada para toda a experiência.



Figura 11 - Preparação das soluções a utilizar: do lado esquerdo, o alimento preparado; do lado direito, várias soluções teste já preparadas.

De referir que, para evitar flutuações no tipo de alimento, todo o alimento foi preparado a partir das mesmas embalagens de fermento e levedura.

2.7. Procedimento experimental

Todas as experiências foram realizadas utilizando náuplios com menos de 24h de vida. Para tal, e como referido anteriormente, foram utilizados quistos recolhidos em laboratório (*A. parthenogenetica*) e obtidos comercialmente (*A. franciscana*). No dia anterior ao início das experiências foram colocados a eclodir, em recipientes com água do mar a $28\pm1^{\circ}\text{C}$, filtrada e esterilizada, com aeração e luminosidade constante, quistos das 3 populações a testar.

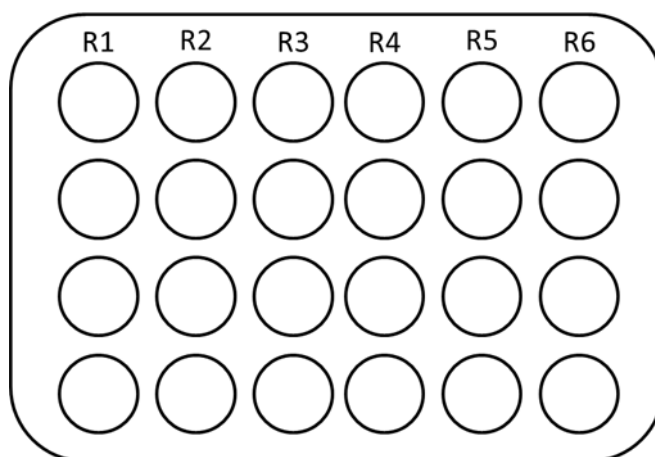


Figura 12 - Esquema da constituição de uma microplaca.

Aproximadamente 24h depois de colocar a eclodir os quistos, foi controlado o número de náuplios viáveis para ver se era possível dar início aos testes, e em caso afirmativo, a quantos testes era possível dar início. Cada condição a testar era composta por três microplacas de 24 poços (uma população de *Artemia* por placa), onde eram colocados 4 náuplios por poço. Cada coluna de poços numa microplaca constituía uma réplica. Assim, cada placa era composta 96 náuplios, divididos em 6 réplicas (figura 12). Para iniciar os testes, os náuplios recolhidos eram colocados inicialmente num gobelé com água destilada, sendo depois transferidos para outro gobelé que continha aproximadamente 100ml da solução a testar (figura 13).



Figura 13 - Passo intermédio, onde os nauplios eram lavados na solução a testar.

Este passo era crucial, pois só assim se conseguia evitar que houvesse contaminação dos meios a testar aquando da transferência dos náuplios para as microplacas. Em cada poço eram colocados 3ml da solução a testar, sendo depois transferidos 4 náuplios. Por fim, era adicionado a cada poço 40 μ L de alimento, sendo que a alimentação era efetuada apenas no primeiro dia de experiência e posteriormente apenas a cada 7 dias passados. As microplacas, depois de preparadas, eram colocadas numa câmara de temperatura controlada, a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo 12:12, sendo apenas retiradas a cada dois dias para efetuar o controlo da sobrevivência dos náuplios. O controlo da sobrevivência era efetuado utilizando uma lupa binocular de forma a facilitar a visualização dos náuplios. Os náuplios eram considerados vivos enquanto efetuassem qualquer movimento, e no caso dos náuplios que estavam imóveis, estes só eram considerados mortos quando não efetuavam rigorosamente

nenhum movimento, mesmo após leve agitação da microplaca. O número de indivíduos vivos era registado em folhas previamente preparadas para o efeito, sendo depois registado em computador, numa folha Excel.

2.8. Tratamento estatístico dos dados

Foram elaborados gráficos, utilizando o programa Microsoft Office Excel 2010, para melhor evidenciar a variação espaço-temporal dos parâmetros determinados. A representação dos parâmetros determinados consistiu na elaboração de gráficos de linhas.

Para verificar se os diferentes meios testados tinham influência sobre a sobrevivência das populações testadas, foram realizados testes de análise de variância (ANOVA), com $\alpha=0,05$, recorrendo ao software STATISTICA, versão 12.0.

Uma análise de variância é um teste onde as médias de vários grupos são comparadas, de forma a determinar se o fator testado tem influência significativa sobre essas médias.

Antes de efetuar testes estatísticos, foram elaborados *box-plots*, utilizando a mediana \pm percentil, o que permitiu observar a existência de *outliers* moderados e extremos, que, para obtenção de resultados mais fidedignos, eram eliminados da amostra. Foi utilizada a mediana, pois esta é uma medida de tendência central.

Após retirar os *outliers*, era então realizada uma análise de variância, realizando testes Tukey sempre que havia diferenças significativas nos dados, para determinar entre quais testes havia diferenças significativas teste.

Foram também elaborados gráficos de barras utilizando os dados já depois de tratados estatisticamente. Os gráficos referentes aos testes da composição iónica foram todos realizados utilizando a média \pm erro padrão.

Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

3.1. Parâmetros físico-químicos da água

As representações gráficas a seguir apresentadas não sofreram qualquer tipo de tratamento estatístico, uma vez que estes dados são apenas de carácter quantitativo e não qualitativo.

3.1.1. Profundidade média

O conhecimento dos parâmetros referentes às dimensões de um corpo de água é importante uma vez que permite estimar a quantidade de água presente no local num exato momento.

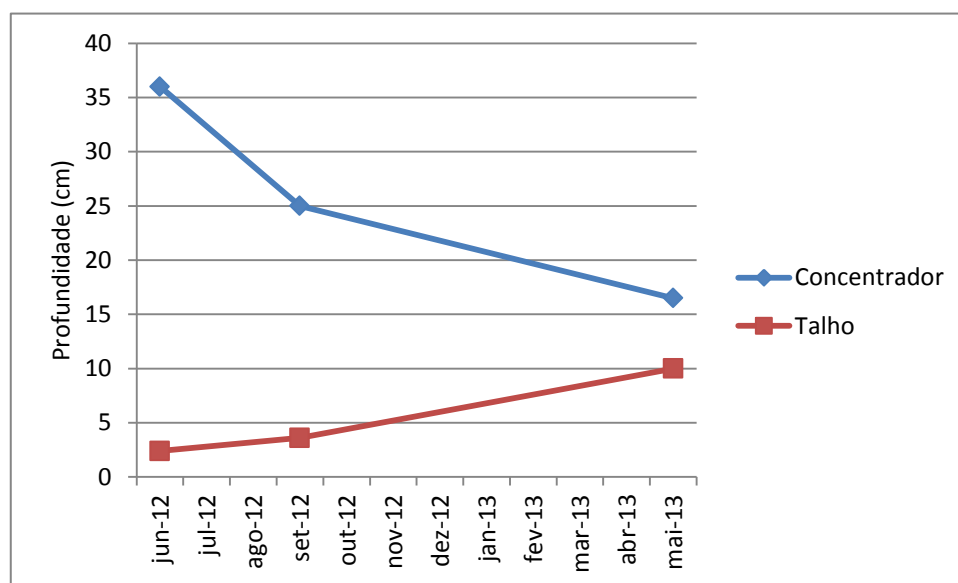


Figura 14 - Variação espaço-temporal da profundidade (cm).

Analisando a figura 14 é possível verificar situações inversas no que toca à profundidade. No caso do concentrador, a profundidade média diminuiu ao longo do tempo, enquanto a profundidade média no talho aumentou. Neste caso, estas flutuações são devidas não só à variação sazonal, mas também à ação da exploração salina, uma vez que esta está interligada à variação sazonal. No caso das colheitas de junho e setembro de 2012, uma vez que estava a haver exploração de sal, as salinas estavam em funcionamento. Isso fez com que houvesse uma extração ativa de água do poço, acumulando a água nos concentradores. No entanto, como foi um verão

longo e quente, o curso de água que atravessa o poço reduziu o caudal, justificando-se assim a redução da profundidade média no concentrador no mês de setembro, apesar de as salinas estarem a laborar. Já no mês de maio de 2013, como as salinas ainda não estavam em fase de produção, não havia extração ativa de água do poço, havendo assim apenas água residual mantida nos concentradores, o que justifica a baixa profundidade.

No que toca ao talho, nos meses de verão, como era de esperar, a profundidade é menor para assim acelerar o processo de produção de sal. A pequena variação que há entre junho e setembro de 2012 deve-se certamente ao processo de produção de sal, pois como é um processo artesanal é complicado colocar sempre o mesmo volume de água no talho. Em maio de 2013, a profundidade é maior, pois além de as salinas ainda não estarem em funcionamento, houve também muita pluviosidade até essa altura do ano.

De referir que não foi efetuada nenhuma medição da profundidade do poço, devido às inerentes dificuldades e perigos colocados pela acessibilidade ao poço.

3.1.2. Temperatura do Ar e da Água

A temperatura do ar e da água são fatores ecológicos de grande importância no funcionamento de um ecossistema aquático, uma vez que influenciam os restantes parâmetros físico-químicos. A temperatura do ar sofre grande influência da geografia e dos movimentos do ar. Já a temperatura da água varia com o ciclo diário e ciclo sazonal.

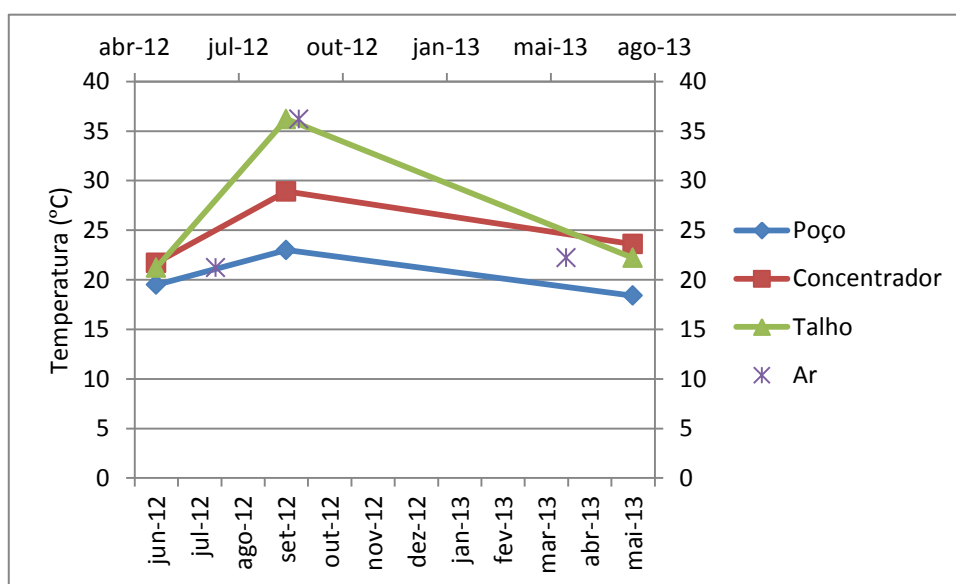


Figura 15 - Variação espaço-temporal da temperatura da água, e variação temporal da temperatura do ar (°C).

Como se pode ver figura 15, a temperatura mais alta, em todos os pontos de amostragem, foi registada no mês de setembro, sendo, nas restantes colheitas, mais baixas e relativamente similares. A temperatura da água acompanhou ainda a temperatura do ar, havendo mesmo locais onde a temperatura da água era superior à do ar. Isto deve-se ao elevado calor específico da água, que permite uma conservação do calor, proporcionando assim um ambiente muito mais estável do que os ambientes terrestres.

3.1.3. Alcalinidade

A medição da alcalinidade é uma forma de medir a capacidade da água neutralizar ácidos. A alcalinidade depende de variáveis como o tipo de leito do corpo de água, dos compostos existentes na água, nomeadamente compostos carbonatados, entre outros. A alcalinidade é medida em mg/L CaCO_3 .

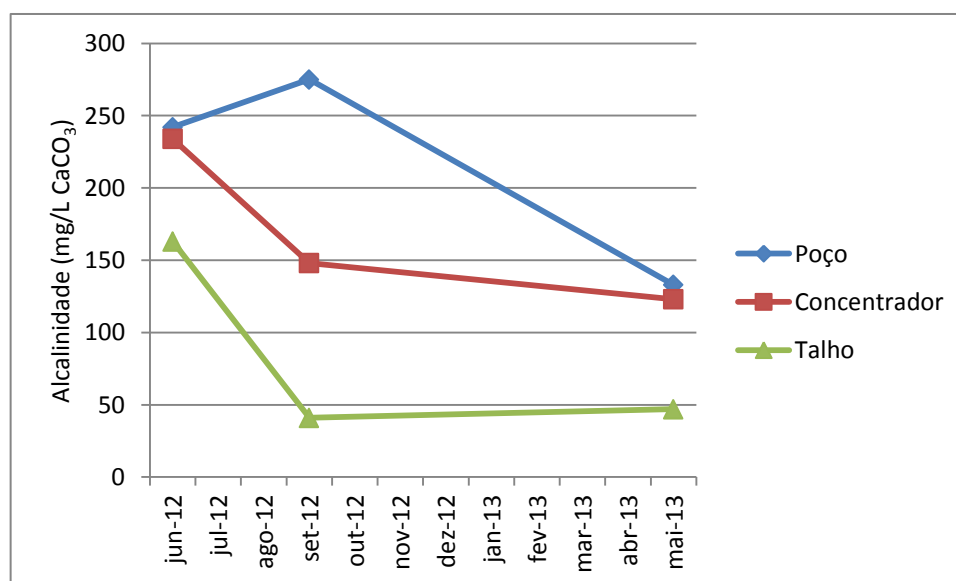


Figura 16 - Variação espaço-temporal da alcalinidade (mg/L CaCO_3).

Em todas as colheitas (figura 16), o valor mais alto encontrado foi sempre na água à saída do poço. Isso pode ser explicado pelo facto de as salinas estarem localizadas num maciço calcário, o que influencia a alcalinidade da água. Já no concentrador e talho, o valor da alcalinidade reduz. Isso poderá ser provocado pela precipitação do sulfato e carbonato de cálcio devido ao aumento da concentração da água (Baseggio, 1973). Na última amostragem, a alcalinidade da água à saída do poço reduz bastante. Isso terá sido provocado pelo aumento da pluviosidade nessa altura do ano, o que fez com que a água à saída do poço estivesse muito mais diluída que o normal.

3.1.4. pH

A medição de pH é utilizada para determinar o carácter ácido ou básico de uma solução. O pH depende da origem da água, nomeadamente no que toca à natureza geológica, e também das condições meteorológicas, nomeadamente no caso das chuvas ácidas. A maior parte dos organismos marinhos prefere um pH entre o 6.5-8.0, uma vez que um pH fora dessa gama provoca o stresse fisiológico nos organismos, provocando a redução da reprodução. pH baixo proporciona ainda o aparecimento de elementos tóxicos no meio.

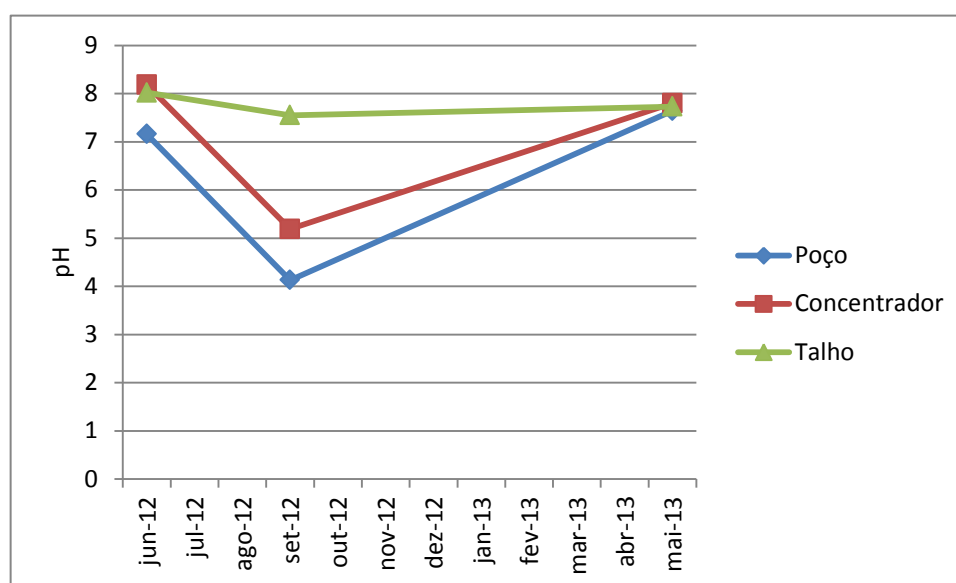


Figura 17 - Variação espaço-temporal do pH.

Na salina de Rio Maior, o pH manteve-se relativamente constante, exceto no mês de setembro de 2012 (figura 17). Nessa amostragem, o pH da água do poço e do concentrador era relativamente ácido. Uma vez que essa colheita ficou marcada por ser a colheita efetuada no dia de maior calor, é rejeitada a hipótese de o pH ácido se dever a chuvas ácidas. Assim, a mais provável razão para tal pH, prende-se na hipótese de este se dever a um *input* que afetou o curso de água que atravessa o poço.

3.1.5. Salinidade

A salinidade é um dos fatores mais importantes na vida dos organismos aquáticos marinhos, podendo influenciar o efeito de outros fatores físicos da água,

nomeadamente a temperatura (Browne e Wanigasekera, 2000), podendo influenciar também fatores químicos da água, como o oxigénio dissolvido (Wachter *et al*, 1994).

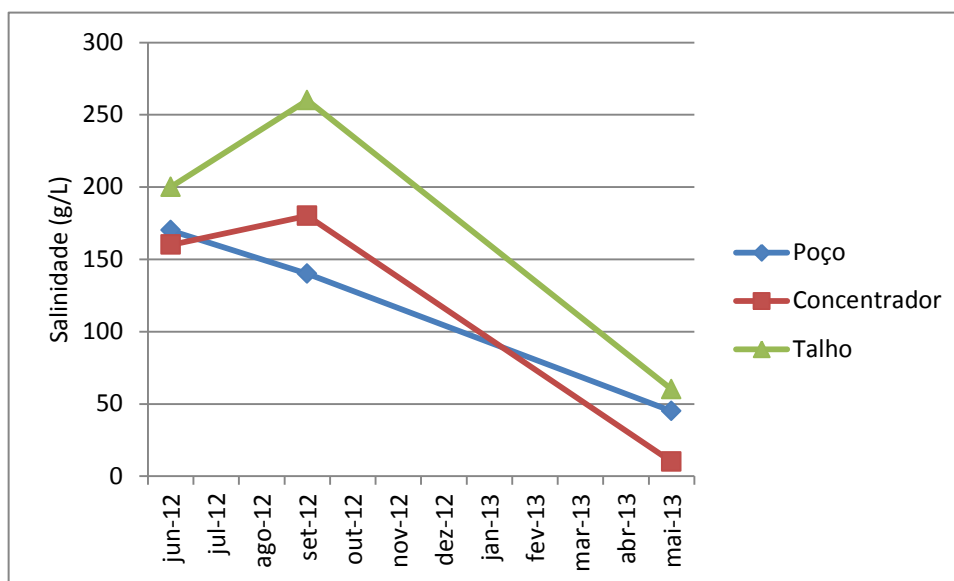


Figura 18 - Variação espaço-temporal da salinidade (g/L).

A salinidade nos pontos de amostragem (figura 18) é representativa do estado de funcionamento da salina: nos meses de junho e setembro de 2012, estas encontravam-se em funcionamento, enquanto em maio de 2013, como houve muita pluviosidade, as salinas estavam inativas, não havendo exploração de sal.

Analisando a salinidade em termos de distribuição espacial, é possível notar que o talho é o local onde se encontra sempre a salinidade mais elevada, mesmo na colheita referente ao mês de maio de 2013. Isso deve-se muito ao volume de água no talho: uma vez que o volume de água é muito reduzido em relação aos outros pontos de amostragem, é normal que nas mesmas condições atmosféricas, a água do talho fique com concentrações mais elevadas que nos outros pontos de amostragem. A diferença da salinidade no talho entre os meses de junho e setembro de 2012 deve-se certamente ao tempo decorrido desde que foi colocada nova água no talho: em junho a água teria sido transferida à pouco tempo, pois no concentrador a salinidade era pouco inferior à do talho, enquanto em setembro a água já estaria à mais tempo no talho, uma vez que a salinidade era já consideravelmente mais alta que no concentrador. No mês de junho de 2012, a salinidade no concentrador era ligeiramente inferior à do poço de extração, provavelmente devido à periodicidade com que a água é extraída: nessa data, o poço estava praticamente sem água, o que fazia com que a água à saída de lá tivesse uma salinidade elevada, já a água contida no concentrador pode ter sido retirada numa altura em que havia maior volume de água

dentro do poço, diminuindo assim a salinidade inicial. Já no mês de maio de 2013, verifica-se novamente uma salinidade mais alta no poço do que no concentrador. Isso seria devido ao facto de o concentrador estar completamente sujeito às condições meteorológicas, retendo mais água que o poço uma vez que a área correspondente ao concentrador é maior que a do poço. Além disso, apesar de o poço nessa data estar completamente cheio, a água lá contida estava em permanente contacto com o maciço de sal-gema, dissolvendo-o, aumentando assim a salinidade. De referir que no mês de setembro de 2012, tendo ocorrido uma longa vaga de calor, a salinidade nos vários locais amostrados, segue o gradiente esperado de uma salina: aumenta desde a fonte até ao local de extração do sal.

3.1.6. Oxigénio dissolvido

O oxigénio dissolvido (O.D.) disponível na água é de extrema importância para os organismos marinhos. A concentração de O.D. é um dos principais fatores que determina o tipo e abundância de organismos presentes no meio. Tanto a temperatura como a salinidade afetam inversamente a concentração de O.D. na água. Isso acontece porque a capacidade de o oxigénio se dissolver na água reduz à medida que a temperatura e salinidade aumentam. O incremento dos níveis de O.D. na água pode ocorrer simplesmente através das trocas gasosas com a atmosfera, pela atividade fotossintética das plantas e algas e também através da agitação da água. Os níveis de O.D. variam também com a sazonalidade, sendo os valores mais altos encontrados no inverno, e os mais baixos no final do verão. Os níveis de O.D. encontrados nos locais de amostragem (figura 19) estão em conformidade com o que foi dito em relação à variação de O.D..

Os valores de O.D. mais baixos foram encontrados nos meses de junho e setembro de 2012, e isso é justificado pelo facto de nessas datas a salina estar a produzir sal, pelo que a salinidade nos vários locais de amostragem era sempre bastante elevada. Já na colheita de maio de 2013, os valores de O.D. são substancialmente mais altos, sendo isso justificado pela baixa salinidade encontrada, nomeadamente no concentrador, local onde foi encontrada a mais baixa salinidade de todas as colheitas, e consequentemente o mais alto valor de O.D..

Em termos de variação espacial, é de notar que o concentrador foi sempre o local onde foram encontrados os valores de O.D. mais altos em cada colheita. Nos meses de junho e setembro de 2012, merece destaque a diferença de O.D. no poço e no concentrador.

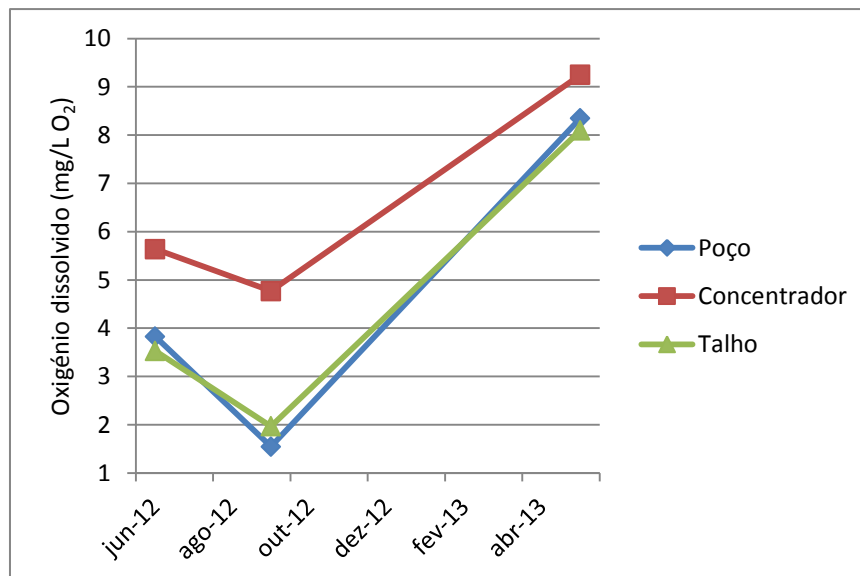


Figura 19 - Variação espaço-temporal do oxigénio dissolvido (mg/L O₂).

Se no mês de junho a salinidade e temperatura nestes dois locais é idêntica, o mesmo não se pode dizer do mês de setembro, onde a salinidade no concentrador é quase 30% mais alta e a temperatura 6°C mais alta que no poço, sendo por isso de admirar o concentrador ter níveis de O.D. mais altos que no poço. Isso é explicado pelo facto de o concentrador ter uma área maior que o poço, o que permite uma maior superfície da água em contacto com a atmosfera, possibilitando isso uma maior troca gasosa, aumentando assim os níveis de O.D. na água do concentrador.

3.1.7. Sólidos Dissolvidos Totais (S.D.T.)

Os S.D.T. consistem nos iões dissolvidos na água com menos de 2 µm de tamanho. Assim, os valores de S.D.T. variam com a composição iónica da água, nomeadamente com a presença de iões como cloreto, sódio, cálcio, nitrato, entre outros. A concentração de S.D.T. na água influencia o balanço osmótico da água entre o meio e o corpo dos organismos, pois num meio com elevada concentração de S.D.T. a tendência da água será sair do meio menos concentrado (corpo do organismo) para o meio mais concentrado (água).

A variação dos S.D.T. nos locais de amostragem (figura 20) segue, como era de esperar, a mesma tendência que a salinidade nesses locais.

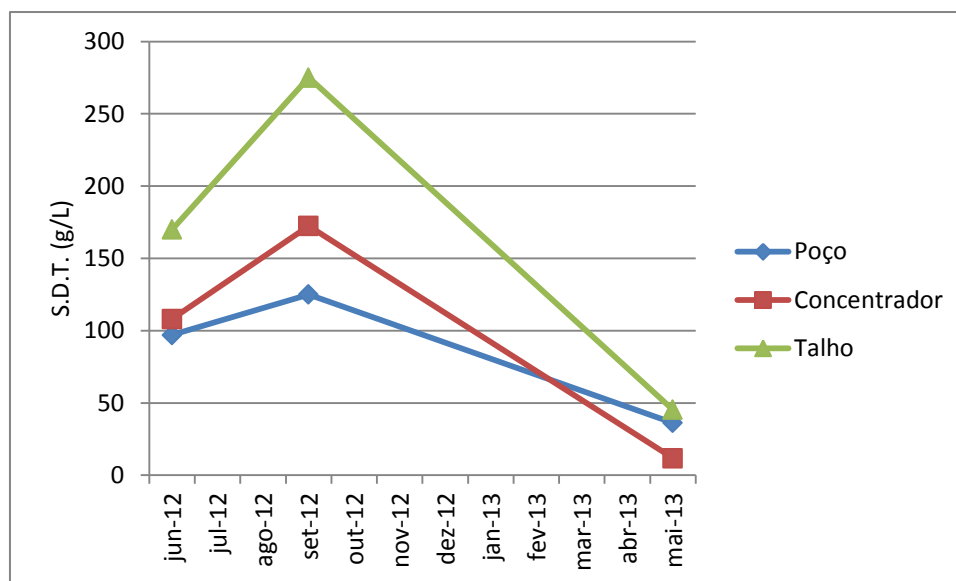


Figura 20 - Variação espaço-temporal dos S.D.T. (g/L).

Os S.D.T. aumentam quando a salinidade aumenta, pois há um maior teor de iões dissolvidos na água. Como se pode verificar na figura 20, as colheitas com menores concentrações de S.D.T. foram efetuadas em maio de 2013, mês no qual houve elevada pluviosidade.

3.1.8. Nitratos

O nitrato é um composto azotado inorgânico que atua como nutriente essencial ao desenvolvimento das plantas, no entanto, quando em excesso juntamente com fosfato, acelera o processo de eutrofização do meio. Normalmente, a concentração de nitrato na água anda em redor de 1 mg/l. A concentração de nitrato no meio pode sofrer aumentos abruptos devido ao lixiviamento de campos de cultivo, fugas de fossas sépticas, descargas industriais, entre outros (OhioEPA, 2005).

Analisando a figura 21 é possível verificar um pico de nitrato na colheita de setembro de 2012, sendo as concentrações de nitrato em junho de 2012 e maio de 2013 bastante semelhantes. Este pico poderá ser explicado pela localização da salina: uma vez que se encontra num vale calcário onde a agricultura tradicional é praticada, é possível que tenha havido escorrências dos fertilizantes para a nascente que alimenta a salina, justificando assim o pico de nitrato encontrado.

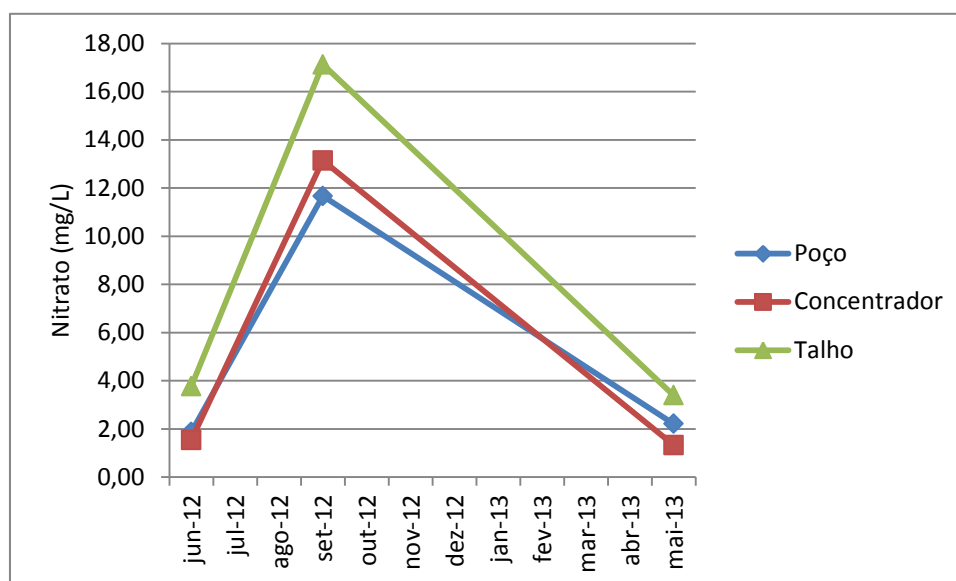


Figura 21 - Variação espaço-temporal da concentração de nitratos (mg/L).

3.1.9. Nitritos

O nitrito é, como o nitrato, um composto azotado inorgânico. A sua ocorrência na água é normalmente devida à oxidação incompleta da amónia, ou da redução incompleta do nitrato. Normalmente não estão presentes no meio, podendo por vezes ocorrer em concentrações muito reduzidas, sendo sempre muito tóxico para os organismos aquáticos.

Em nenhuma das colheitas efetuadas foi detetada qualquer concentração de nitrito.

3.1.10. Fosfatos

O fosfato é, juntamente com o nitrato, um dos nutrientes essenciais para os organismos que compõe a cadeia trófica aquática. No meio ambiente pode surgir de forma inorgânica, sendo utilizado pelas plantas e animais, ou orgânica, sendo utilizado apenas pelos animais. Os níveis de fosfato no meio podem ser influenciados como todos os outros nutrientes: lixiviamento de campos fertilizados, fugas de fossas sépticas, esgotos industriais, entre outros. A ocorrência de níveis altos de fosfato pode também acelerar a eutrofização do meio. Os níveis de fosfato encontrados na salina (figura 22) são bastante similares, podendo estes ser justificados pela ocorrência natural no meio, ou então com o método de medição, uma vez que o método de medição é extremamente sensível no que toca à adição do reagente e posterior agitação da amostra.

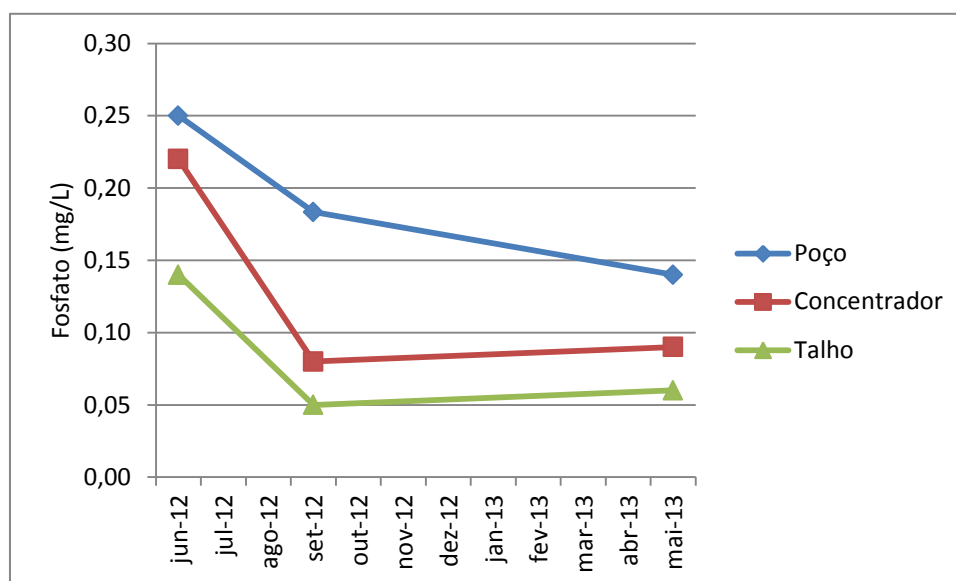


Figura 22 - Variação espaço-temporal da concentração de fosfatos (mg/L).

3.1.11. Amónia

O azoto amoniacal é composto pela forma ionizada (ião amónio, NH_4^+) e não ionizada (amoníaco, NH_3). Em termos de toxicidade, a forma não ionizada é mais tóxica, sendo por isso comumente associada à morte de peixes, sendo também associada a problemas nas brânquias, nomeadamente hiperplasia das lamelas branquiais.

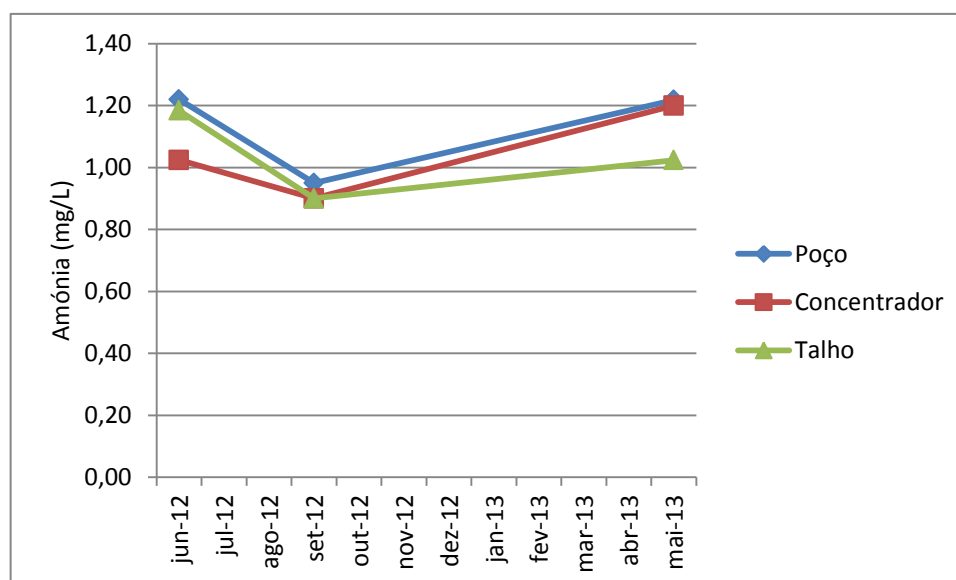


Figura 23 - Variação espaço-temporal da concentração de amónia (mg/L).

O aparecimento de amónia nos corpos de água pode ter vários motivos: a partir da decomposição de azoto orgânico por microrganismos, a partir de fossas, a partir da

agricultura, através de descargas industriais, produtos de excreção dos organismos, entre outros.

O efeito da amónia nos organismos sofre também efeitos de outros parâmetros físico-químicos da água: a toxicidade da amónia aumenta com o aumento da temperatura, a redução do pH faz com que haja mais amónia na forma não ionizada, que é mais tóxica, e o aumento da salinidade pode aumentar a tolerância à amónia.

Os valores de amónia registados na salina (figura 23) mantiveram-se relativamente constantes ao longo das colheitas, podendo-se então considerar que esses serão valores normalmente encontrados na salina.

3.1.12. Cálcio

Nos meios aquáticos, tanto de água doce como de água salgada, o cálcio surge normalmente na sua forma ionizada (Ca^{2+}). A presença de cálcio na água deve-se normalmente a dois motivos: a decomposição de alumino silicatos ricos em cálcio, e/ou devido às características geológicas, uma vez que os meios ricos em pedras calcárias, tendencialmente terão concentrações de cálcio mais altas. Quando a água atravessa solos muito mineralizados, normalmente a dureza de cálcio aumenta, tornando a água dura. Água dura é caracterizada pela dificuldade que os detergentes têm em formar espuma: os iões de cálcio e magnésio ligam-se às moléculas do sabão, tornando a espuma pegajosa, dificultando assim a ação do sabão. Apesar de a dureza da água ser caracterizada pela presença de cálcio e magnésio, normalmente referimo-nos à dureza, como dureza de cálcio (CaCO_3), pois em termos proporcionais, 2/3 da dureza total são referentes à dureza do cálcio, enquanto apenas 1/3 é referente à dureza do magnésio (Neufeld e Cameron, 1993).

Em água doce, as concentrações de cálcio variam normalmente entre 0-100mg/l, enquanto na água do mar, a concentração de cálcio atinge cerca de 400mg/l. Apesar de não ser considerado tóxico, considera-se como limite superior na água de consumo 50mg/l de cálcio. Água com concentrações superiores pode ser problemática devido à formação de depósitos de carbonato de cálcio na canalização ou ao aumento da dificuldade de os detergentes atuarem (Baseggio, 1973).

O cálcio é um mineral com elevada importância para os organismos eucariotas. Nos organismos desempenha normalmente duas funções de grande importância: é parte integrante nos tecidos mineralizados, e atua como agente regulador nos processos fisiológicos. Ao nível dos processos fisiológicos, o cálcio pode atuar como sinalizador intracelular, uma vez que a sua concentração no citoplasma pode ativar reações

fisiológicas e bioquímicas, no entanto, uma concentração muito elevada pode causar danos irreversíveis a nível celular. Em relação aos tecidos mineralizados, estes contêm normalmente grandes concentrações de cálcio, como é o caso dos ossos e do exosqueleto nos crustáceos. Nos crustáceos, a formação da carapaça consiste na calcificação da cutícula mediada por fibras quitino-proteicas. Este processo de calcificação leva a que haja alterações na concentração do cálcio a nível celular: foi já demonstrado que a concentração de cálcio aumenta nos momentos que antecedem a muda da carapaça (Kožíšek, 2003; Luquet e Marin, 2004; Neufeld e Cameron, 1993; Wheatly et al, 2002).

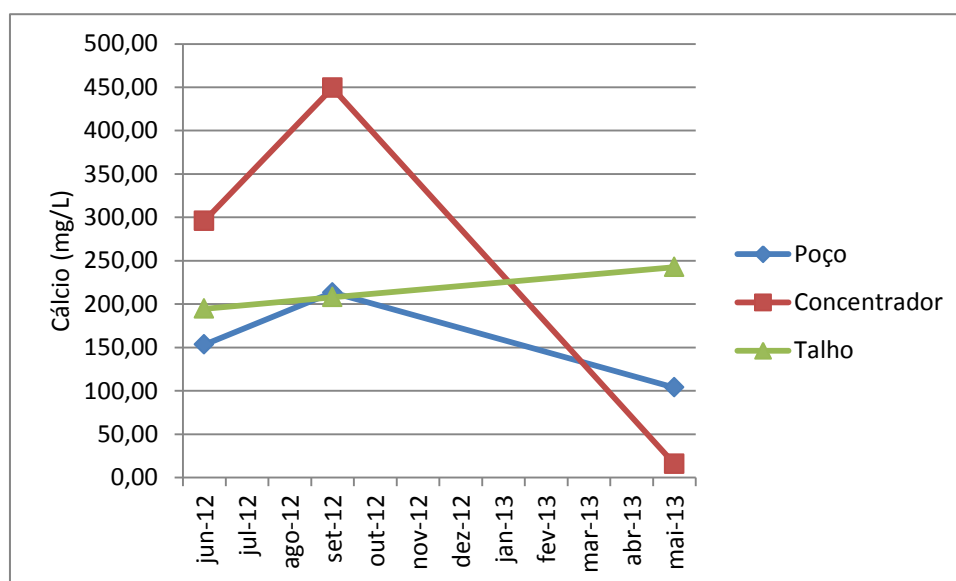


Figura 24 - Variação espaço-temporal da concentração de cálcio (mg/L).

Analisando a figura 24, é possível correlacionar a concentração de cálcio com a salinidade do meio, com o estado de funcionamento da salina, e com a variação temporal, retirando-se algumas conclusões relativamente a isso.

Em junho e setembro de 2012, as concentrações de cálcio no meio estão concordantes com o que seria de esperar numa salina: valores intermédios no local de captação de água, uma vez que a água da fonte atravessa um maciço calcário, aumento da concentração no concentrador, e novamente valores intermédios ou baixos no talho, onde o cloreto de sódio precipita. Isto seria de esperar porque o cálcio começa a precipitar sob a forma de carbonato de cálcio e sulfato de cálcio quando a água atinge concentrações elevadas, sem que no entanto ocorra precipitação de cloreto de sódio (Davis, 2000). Assim, é normal que no concentrador a concentração de cálcio seja máxima, sendo mais baixa no talho, depois de o cálcio ter precipitado no concentrador. Em maio de 2013, a concentração de cálcio é mínima no concentrador,

sendo mais alta no talho. Isso poderá ser explicado pelo não funcionamento da salina: como não havia exploração de sal e era uma época pluviosa, a água contida nos tanques seria na sua maioria água da chuva. Tendo em conta que o concentrador é um tanque de elevado volume, o volume de água da chuva retida é maior que no talho, havendo por isso uma maior diluição do cálcio dissolvido. Isso mesmo é também perceptível na salinidade dos tanques, sendo mais alta no talho do que no concentrador, onde é aliás bastante reduzida. No poço, apesar de também conter água da chuva, há sempre o *input* de água proveniente da nascente subterrânea, e estando sempre em contacto com o maciço calcário, era de esperar que houvesse uma certa concentração de cálcio na água.

3.1.13. Magnésio

O magnésio nos corpos de água está normalmente presente na forma ionizada (Mg^{2+}). As concentrações de magnésio nos ambientes aquáticos variam com a origem da água: no caso da água do mar, a concentração é relativamente constante e alta, em redor de 1300 mg/l, enquanto nos corpos de água doce, a concentração de magnésio é substancialmente mais reduzida, raramente ultrapassando 100mg/l. A diferença de concentração nos dois tipos de água pode ser explicada pela origem da água: a crosta da terra tem valores reduzidos de magnésio, sendo por isso expectável uma concentração reduzida deste metal na água doce, já na água salgada, o magnésio poderá ser proveniente dos sedimentos ricos em carbonato de magnésio. A contaminação de água doce não é muito frequente, no entanto, podem ocorrer *inputs* provenientes da decomposição de alumino silicatos ricos em magnésio. A concentração de magnésio entra também na constituição da dureza da água, sendo no entanto normalmente menor que a concentração do cálcio. Nos humanos, o magnésio é de elevada importância pois funciona como cofator e ativador de mais de 300 reações enzimáticas (Irving, 1926; Kožíšek, 2003). Nas colheitas efetuadas na salina de Rio Maior, os valores de magnésio (figura 25) vão de encontro ao que já foi dito: a concentração de magnésio nas salinas de Rio Maior é bastante mais baixa que na água do mar.

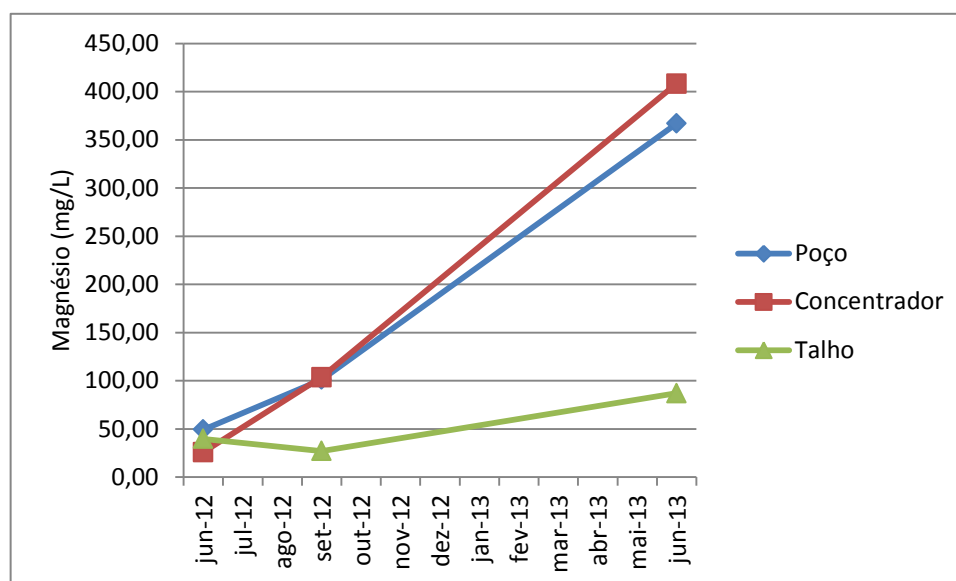


Figura 25 - Variação espaço-temporal da concentração de magnésio (mg/L).

Ao nível do talho, a concentração de magnésio manteve-se relativamente constante, no entanto, em relação ao poço e concentrador, a concentração aumentou sempre, atingindo concentrações na ordem dos 400mg/l. Só no mês de maio de 2013 é que a concentração de magnésio atinge valores anormais para o local. Isso poderá ser devido a diversos *inputs* externos, uma vez que nessa data, como já foi referido, a pluviosidade era mais alta que o normal. Nesse mês, no caso do talho, a concentração aumentou relativamente menos, e isso talvez se deva à localização do talho, que está situado sensivelmente a meio da salina, sendo por isso menos sujeito a *inputs* externos.

3.1.14. Valores medidos em Aveiro

As amostras recolhidas em Aveiro foram utilizadas apenas para medir a salinidade e a concentração de cálcio e magnésio. Em relação à salinidade, esta aumenta à medida que se avança no circuito correspondente à salina: no local da captação da água, a salinidade é igual à da água do mar: 35 g/l, aumentando ligeiramente quando é retida no concentrador, subindo a salinidade para 50 g/l. A água contida no evaporador contém uma salinidade de 120 g/l, sendo a salinidade máxima encontrada no cristizador, onde a concentração é de 410 g/l.

Em relação às concentrações de cálcio e magnésio, os resultados não foram muito extensos, apenas se conseguindo determinar estas concentrações para as amostras recolhidas no canal, onde a concentração de cálcio era de 92 mg/l, enquanto a concentração do magnésio era 2031 mg/l. Nos restantes locais de amostragem, a

concentração de magnésio estava sempre acima do limite de deteção do aparelho (0,5 mg/l), mesmo utilizando uma diluição de 1/7500, enquanto o cálcio estava abaixo do limite de deteção do aparelho (0,04 mg/l), mesmo utilizando a diluição mais baixa possível, 1/2000. Pode-se então assumir que a concentração de magnésio nestes locais seria sempre maior que 3750 mg/l, e que a concentração de cálcio seria sempre inferior a 80mg/l. Para determinação do magnésio, não se procedeu a uma diluição maior, porque quanto maior a diluição, maior significância terá um erro de operação, enquanto no caso do cálcio, a menor diluição possível foi 1/2000, pois com diluições menores, ocorria o aparecimento de precipitados na amostra.

3.2. Avaliação do efeito da concentração de cálcio e magnésio

3.2.1. Estudo intrapopulacional da variação da sobrevivência ao 7º dia

A análise à sobrevivência foi efetuada ao 7º dia de experiência, de forma a poder entrar também em comparação com os estudos efetuados por Bowen *et al*, 1988.

Os resultados obtidos estão sintetizados na tabela 6, já depois de serem tratados estatisticamente.

Tabela 6 - Resumo das sobrevivências observadas ao 7º dia de experiência, mediante a composição do meio (R.M. - *A. parthenogenetica* de Rio Maior; Av. - *A. parthenogenetica* de Aveiro; Af. - *A. franciscana*)

Cód. Teste	Composição meio		% nauplios vivos ao 7º dia		
	mg/l Ca	mg/l Mg	R.M.	Av.	Af.
1	0	0	0	0	0
2	0	50	0	0	0
3	0	100	0	0	0
4	0	450	0	3,1	0
5	0	1300	0	0	0
6	50	0	0	0	0
7	50	50	0	26	0
8	50	100	7,5	38,5	0
9	50	450	28,1	68,8	0
10	50	1300	25	68,8	14,6
11	150	0	0	0	0
12	150	50	13,5	70,3	4,2
13	150	100	9,4	79,2	0
14	150	450	9,4	84,4	7,3
15	150	1300	8,3	78,8	11,5
16	450	0	0	0	0
17	450	50	0	22,9	0
18	450	100	0	43,8	0
19	450	450	5,2	81,3	0
20	450	1300	3,1	78,8	11,5

3.2.1.1. *A.parthenogenetica* de Rio Maior

Foi inicialmente realizada uma análise de variância (ANOVA) às médias da sobrevivência de *A.parthenogenetica* aos diferentes testes efetuados. Uma vez que todos os testes cuja mortalidade fosse diferente de zero davam como estatisticamente diferentes de todos os outros, optamos por retirar esses testes, recomeçando a análise estatística. Após retirar os outliers, foi efetuada nova ANOVA que confirmou a existência de diferenças significativas (tabela 7).

Tabela 7 - Resultado da ANOVA (p) para a população de *A.parthenogenetica* de Rio Maior.

Variável	df Effect	df Error	p
População	8	42	0,000002

Para determinar entre quais testes havia diferenças significativas foi efetuado um teste de variância múltipla Tukey (tabela 8).

Tabela 8 - Resultado do teste Tukey (p) para a população de Rio Maior, evidenciando entre quais testes a diferença foi significativa.

Teste	8	9	10	12	13	14	15	19	20
8		0,002055	0,013799	0,999797	0,999977	0,999977	1,000000	0,999894	0,989107
9	0,002055		0,998937	0,009507	0,002164	0,002164	0,001078	0,000222	0,000156
10	0,013799	0,998937		0,055769	0,039992	0,039992	0,022379	0,003430	0,000962
12	0,999797	0,009507	0,055769		1,000000	1,000000	0,999991	0,980606	0,859295
13	0,999977	0,002164	0,039992	1,000000		1,000000	1,000000	0,985694	0,862004
14	0,999977	0,002164	0,039992	1,000000	1,000000		1,000000	0,985694	0,862004
15	1,000000	0,001078	0,022379	0,999991	1,000000	1,000000		0,997960	0,945882
19	0,999894	0,000222	0,003430	0,980606	0,985694	0,985694	0,997960		0,999897
20	0,989107	0,000156	0,000962	0,859295	0,862004	0,862004	0,945882	0,999897	

Foi ainda realizado um gráfico (figura 26) que ajuda, visualmente, a perceber os resultados do teste Tukey.

Olhando para os resultados do teste Tukey, é possível ver que o teste 9 só não é estatisticamente diferente do teste 10, enquanto o teste 10 não é diferente estatisticamente dos testes 9 e 12, sendo que o teste 12 só difere estatisticamente do teste 9. Todos os outros testes não apresentam diferença estatística entre si. Analisando a figura 27 e a tabela 6 percebe-se que os testes 9 e 10 tem percentagens de sobrevivência próximas, além de serem mais de 2 vezes mais altos que todos os outros testes. A sobrevivência do teste 10 é também mais alta que no teste 12, mas apesar disso a diferença não é significativa. Analisando bem os valores de p entre esses dois testes, podemos ver que não é significativa, mas quase, tendo um valor de 0,055, podendo isso ser devido ao facto de uma das réplicas de cada teste ter percentagem de sobrevivência igual.

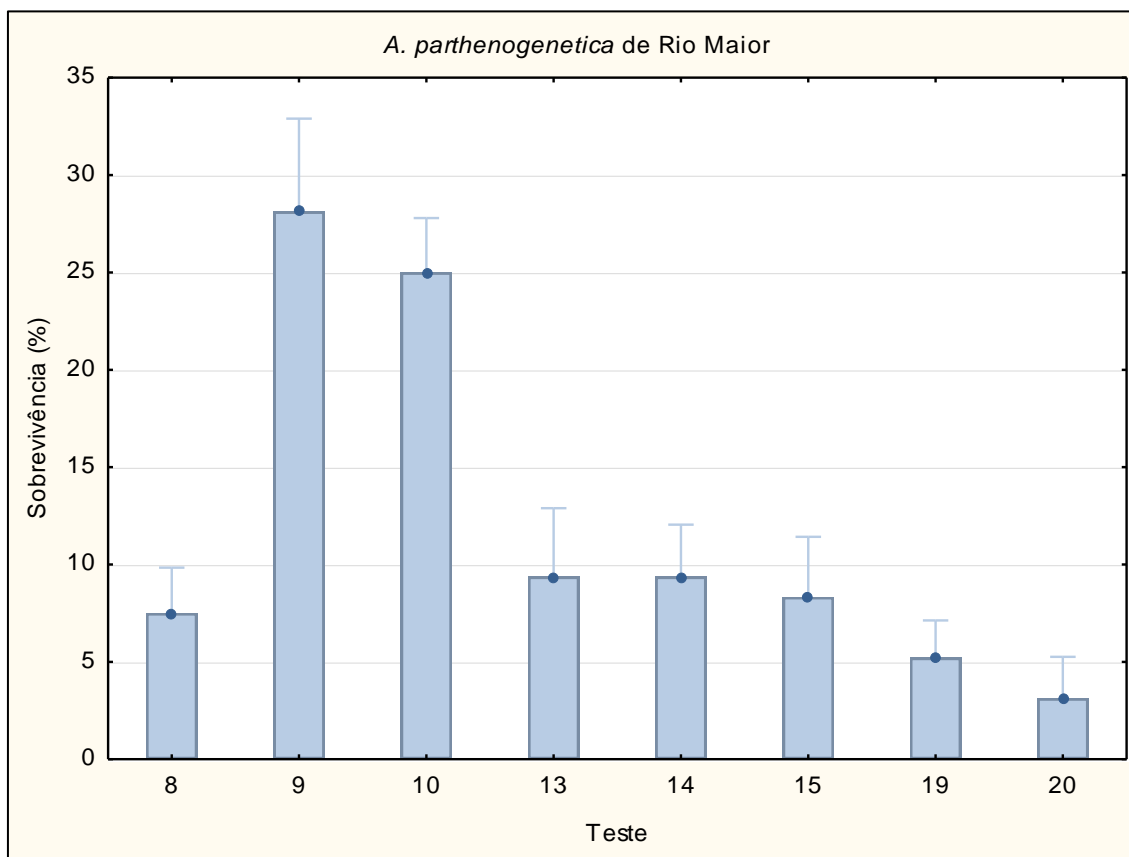


Figura 26 - Influência dos testes na percentagem de sobrevivência da população de *A. parthenogenetica* de Rio Maior.

Em termos de sobrevivência às concentrações, é possível verificar que a completa ausência de magnésio nunca permite a sobrevivência de *A. parthenogenetica* de Rio Maior. As melhores percentagens de sobrevivência foram obtidas nas duas concentrações de magnésio mais altas, quando conjugadas com a concentração de cálcio mais baixa. No entanto, é possível verificar que nos testes realizados com concentração de cálcio de 150 mg/l, só não houve sobrevivência na ausência de magnésio, pois nos outros testes (12, 13, 14 e 15) a sobrevivência foi bastante similar. Se olharmos para os valores encontrados nas salinas, podemos verificar que no talho, são normalmente encontradas concentrações de cálcio na ordem dos 200 mg/l, enquanto a concentração de magnésio oscila entre 20 e 100 mg/l. Isto é elucidativo da adaptação da população da salina de Rio Maior aos valores normalmente encontrados nos talhos.

3.2.1.2. *A. parthenogenetica* de Aveiro

Após realizar uma ANOVA inicialmente, foi possível constatar a existência de diferenças significativas (tabela 9).

Tabela 9 - Resultado da ANOVA (p) para a população de *A.parthenogenetica* de Aveiro.

Variável	df Effect	df Error	p
População	12	60	0,000000

Para realização do teste Tukey foram também retiradas as populações com valor de sobrevivência 0, para perceber quais testes diferiam estatisticamente (tabela 10).

Tabela 10 - Resultado do teste Tukey (p) da população de Aveiro evidenciando entre quais testes a diferença foi significativa.

Teste	4	7	8	9	10	12	13	14	15	17	18	19	20
4		0,00254	0,00012	0,00012	0,00012	0,00012	0,00012	0,00012	0,00012	0,01673	0,00012	0,00012	0,00012
7	0,00254		0,44198	0,00012	0,00012	0,00012	0,00012	0,00012	0,00012	0,99999	0,05209	0,00012	0,00012
8	0,00012	0,44198		0,00014	0,00014	0,00043	0,00012	0,00012	0,00012	0,14071	0,99825	0,00012	0,00012
9	0,00012	0,00012	0,00014		1,00000	1,00000	0,71566	0,14071	0,85601	0,00012	0,00071	0,58592	0,85601
10	0,00012	0,00012	0,00014	1,00000		1,00000	0,71566	0,14071	0,85601	0,00012	0,00071	0,58592	0,85601
12	0,00012	0,00012	0,00043	1,00000	1,00000		0,96993	0,57638	0,97932	0,00012	0,00545	0,87335	0,97932
13	0,00012	0,00012	0,00012	0,71566	0,71566	0,96993		0,99825	1,00000	0,00012	0,00012	1,00000	1,00000
14	0,00012	0,00012	0,00012	0,14071	0,14071	0,57638	0,99825		0,99847	0,00012	0,00012	1,00000	0,99847
15	0,00012	0,00012	0,00012	0,85601	0,85601	0,97932	1,00000	0,99847		0,00012	0,00013	1,00000	1,00000
17	0,01673	0,99999	0,14071	0,00012	0,00012	0,00012	0,00012	0,00012	0,00012		0,00910	0,00012	0,00012
18	0,00012	0,05209	0,99825	0,00071	0,00071	0,00545	0,00012	0,00012	0,00013	0,00910		0,00012	0,00013
19	0,00012	0,00012	0,00012	0,58592	0,58592	0,87335	1,00000	1,00000	1,00000	0,00012	0,00012		1,00000
20	0,00012	0,00012	0,00012	0,85601	0,85601	0,97932	1,00000	0,99847	1,00000	0,00012	0,00013	1,00000	

Analisando a tabela do teste Tukey, percebe-se que os resultados são muito mais variados que no caso da população de Rio Maior.

Mais uma vez, recorrendo à análise gráfica (figura 27) e à tabela síntese (tabela 6), percebe-se mais facilmente onde estão as diferenças significativas.

É possível notar a existência de dois grupos: os testes 9, 10, 12, 13, 14, 15, 19 e 20, não diferem entre si, mas diferem de todos os outros testes, enquanto os testes 7, 8, 17 e 18 não diferem entre si, mas diferem com todos os outros testes. De notar ainda que o teste 4 difere de todos os testes. Os testes 9, 10, 12, 13, 14, 15, 19 e 20 são todos testes onde a sobrevivência nunca foi muito inferior a 70%. Nestes testes, a sobrevivência foi sempre aumentando à medida que a concentração do magnésio aumentava, o que era de esperar pois a população de *A.parthenogenetica* de Aveiro estará adaptada a ambientes com alta concentração de magnésio. Os testes 7, 8, 17 e 18 não diferem completamente entre si, no entanto, os testes 17 e 18 apresentam diferenças significativas. O facto de haver diferenças significativas entre os testes 7, 8, 17, 18 e todos os outros testes, é demonstrativo da necessidade que esta população tem em relação ao magnésio: quando o cálcio é intermédio, em qualquer concentração de magnésio se obtém boas percentagens de sobrevivência, no entanto, quando o cálcio tem uma concentração reduzida ou muito elevada, a população de Aveiro tem necessidade de altas concentrações de magnésio para sobreviver.

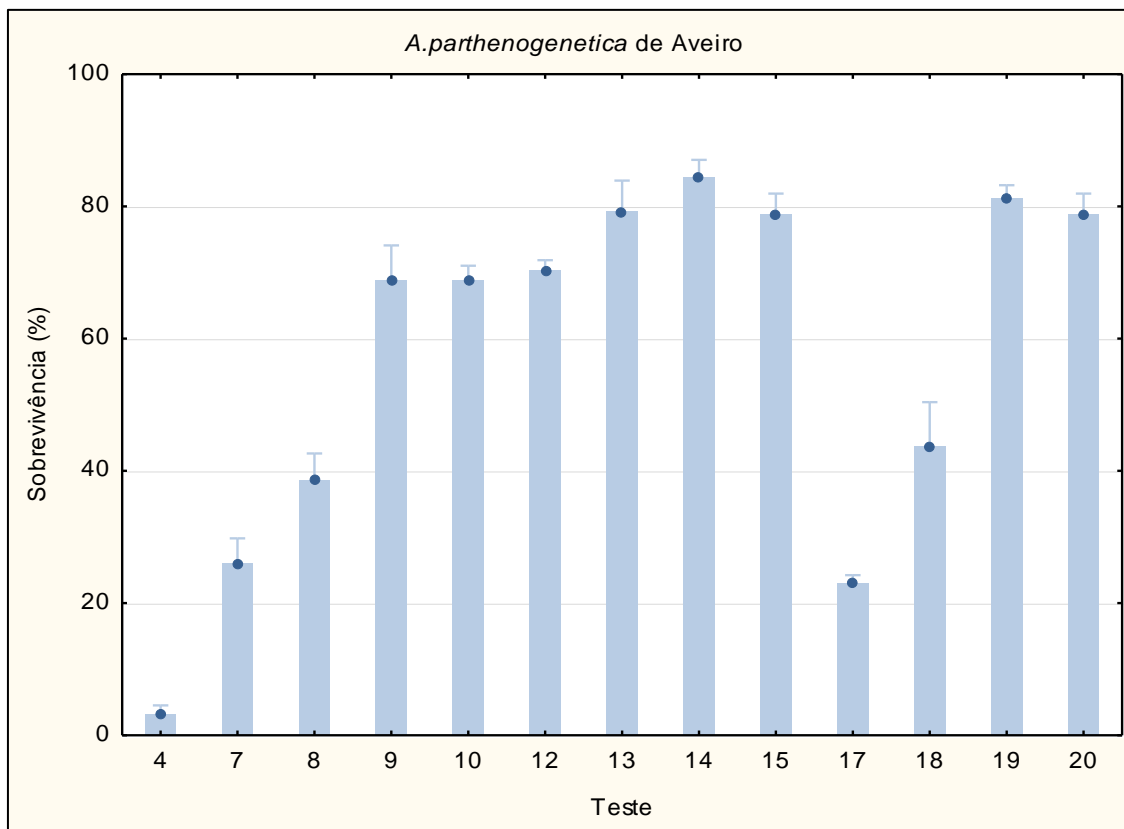


Figura 27 - Influência dos testes na percentagem de sobrevivência da população de *A.parthenogenetica* de Aveiro.

Olhando para os valores de cálcio e magnésio encontrados em Aveiro, ainda que só num ponto de amostragem, percebe-se que a espécie esteja adaptada a valores de cálcio baixos ou intermédios, mas sempre com valores de magnésio altos.

3.2.1.3. *A.franciscana*

Nesta população, foi, mais uma vez, efetuada uma ANOVA de forma a verificar se existiam diferenças entre os testes. Após uma primeira análise, onde foi verificada existência de diferenças estatísticas entre todos os testes com 0% de sobrevivência e os testes onde houve sobrevivência, foram retirados os testes sem sobrevivência, realizando-se nova ANOVA. Neste caso, nos testes onde há sobrevivência, não são verificadas diferenças estatísticas (tabela 11).

Tabela 11 - Resultado da ANOVA (p) para a população de *A.franciscana*.

Variável	df Effect	df Error	p
População	5	25	0,178133

Não se podendo efetuar um teste Tukey, procedeu-se apenas à realização de um gráfico (figura 28) para avaliar a sobrevivência de *A. franciscana* às concentrações testadas.

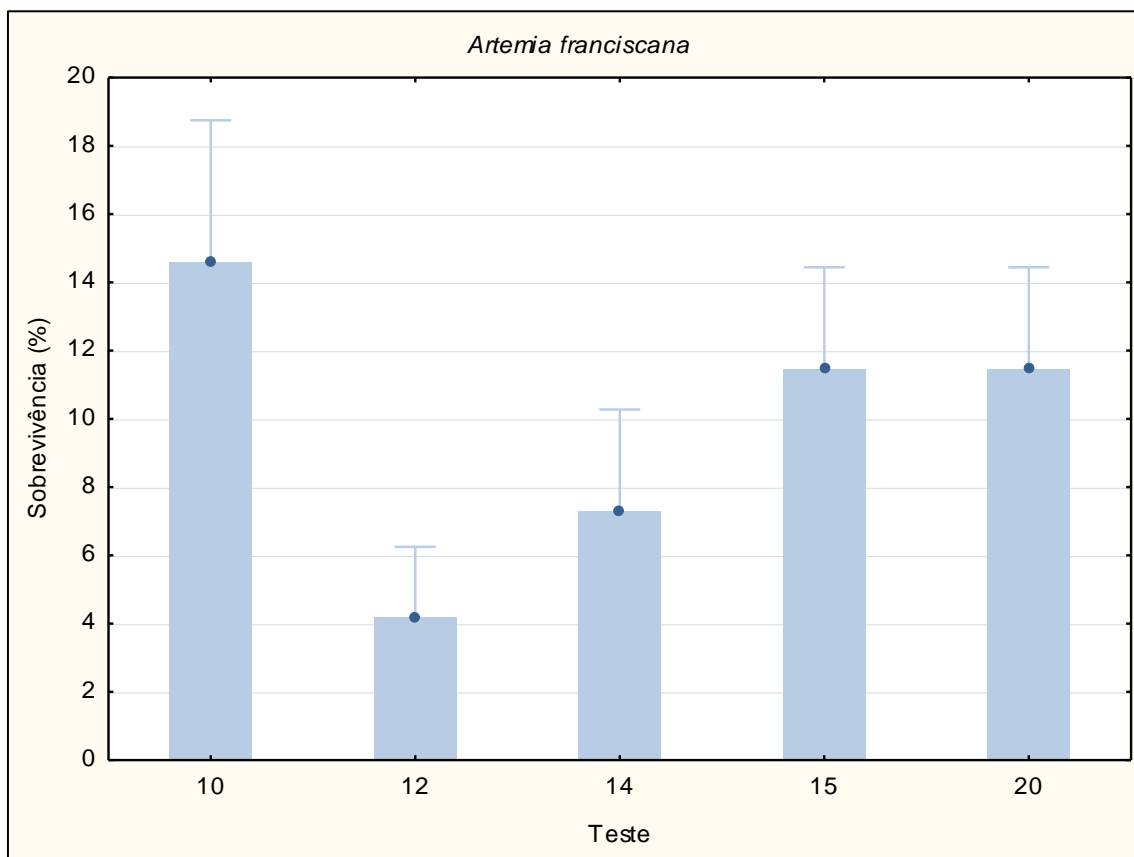


Figura 28 - Influência dos testes na percentagem de sobrevivência da população de *A. franciscana*.

É possível verificar que as sobrevivências mais altas foram sempre encontradas nos testes onde a concentração de magnésio era a máxima, podendo mesmo dizer-se que sobrevivências acima de 10% só são possíveis nos meios com concentração de magnésio igual ou superior a 1300 mg/l.

3.2.2. Estudo interpopulacional da variação da sobrevivência ao 7º dia

Foram também analisadas as sobrevivências das 3 populações em função do teste. Mais uma vez, os testes cuja sobrevivência em todas as populações fosse 0%, foram retirados dos testes estatísticos.

Devido ao facto de terem sido efetuados 13 testes Tukey, os mesmos serão apenas colocados em anexo (Anexo I; Tabela 13), sendo apenas colocados aqui os gráficos referentes aos testes onde mais que uma população tenha sobrevivência diferente de 0%.

Há 4 testes onde apenas a população de Aveiro conseguiu sobreviver 7 dias: teste 4, teste 7, teste 17 e teste 18. No caso do teste 4, esta população obteve uma sobrevivência de apenas 3%. Apesar de ser um resultado estatisticamente diferente dos resultados obtidos pelas outras populações, não podemos considerar que este valor de sobrevivência seja de grande relevância, uma vez que corresponde apenas a 3 artémias de um total de 96, por isso seria pouco expectável que tão baixa percentagem de sobreviventes conseguisse colonizar um local, tendo ainda em conta a composição do meio: completa ausência de cálcio e concentração intermédia de magnésio. No teste 7, 25% da população sobreviveu a concentrações de magnésio e cálcio baixas: apenas 50mg/l de cada. O mesmo sucede no teste 17, onde cerca de 25% da população sobrevive a uma concentração de magnésio baixa, 50 mg/l, e a concentração de cálcio máxima, 450 mg/l. No teste 18 a população obteve uma percentagem de sobrevivência um pouco mais alta, subindo para cerca de 45%.

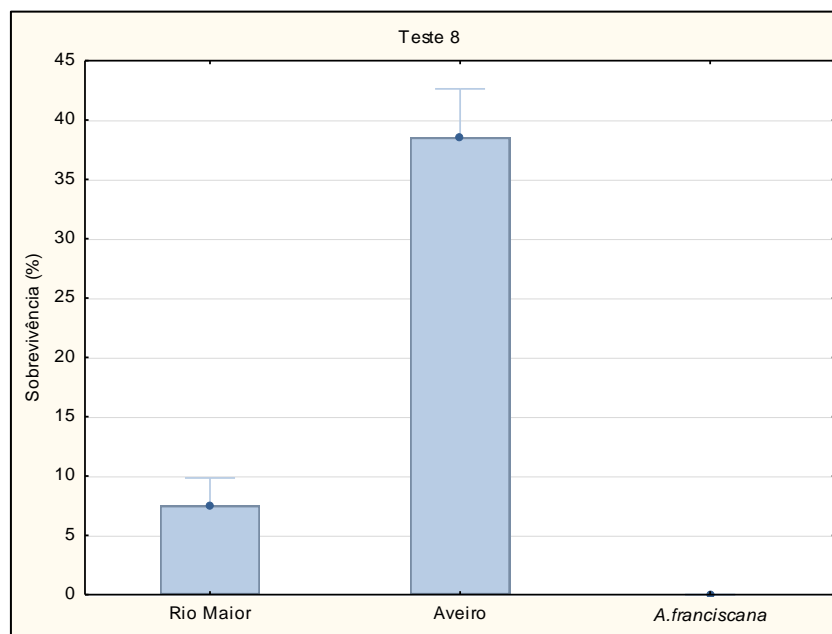


Figura 29 - Variação da influência do teste 8 nas populações testadas.

É fácil perceber que esse aumento de sobrevivência se deve ao aumento da concentração de magnésio, pois no teste 18, o meio contém uma concentração de 100mg/l de magnésio. Analisando a figura 29, é possível verificar que no meio 8, que é pobre em cálcio e magnésio, a população de Aveiro obtém uma percentagem de sobrevivência quase 7 vezes superior à de Rio Maior, sendo que a população de *A. franciscana* nem consegue sobreviver. Isto é demonstrativo de uma maior adaptabilidade ao meio por parte de *A. parthenogenetica* de Aveiro.

No teste 9, a concentração de cálcio é mínima, mas a de magnésio é intermédia.

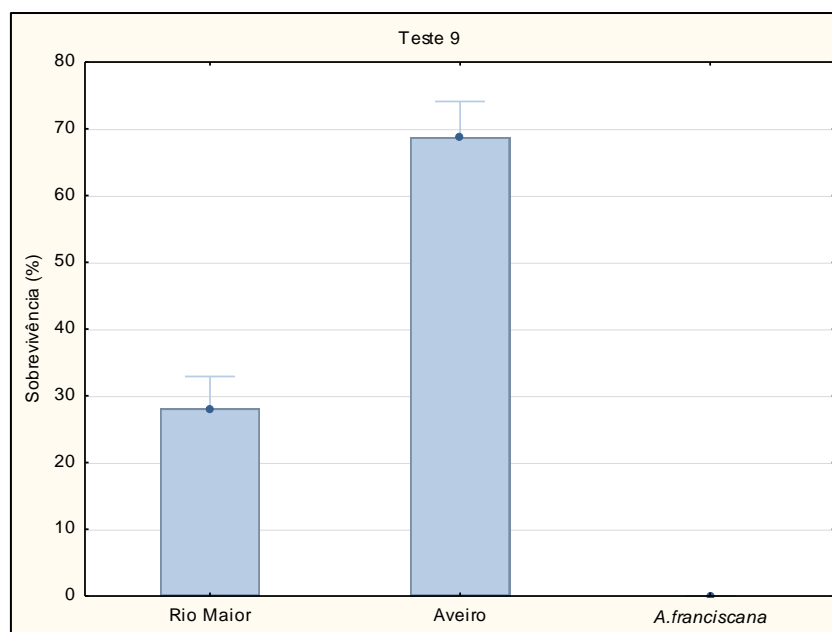


Figura 30 - Variação da influência do teste 9 nas populações testadas.

Perante estas condições, podemos verificar (figura 30) que a sobrevivência das populações de Aveiro e Rio Maior aumenta substancialmente, continuando a população de *A. franciscana* sem sobreviver a estas condições. Isto demonstra que ambas as populações autóctones são dependentes de uma concentração intermédia de magnésio no meio. Este é o único teste onde há diferenças significativas entre todas as populações.

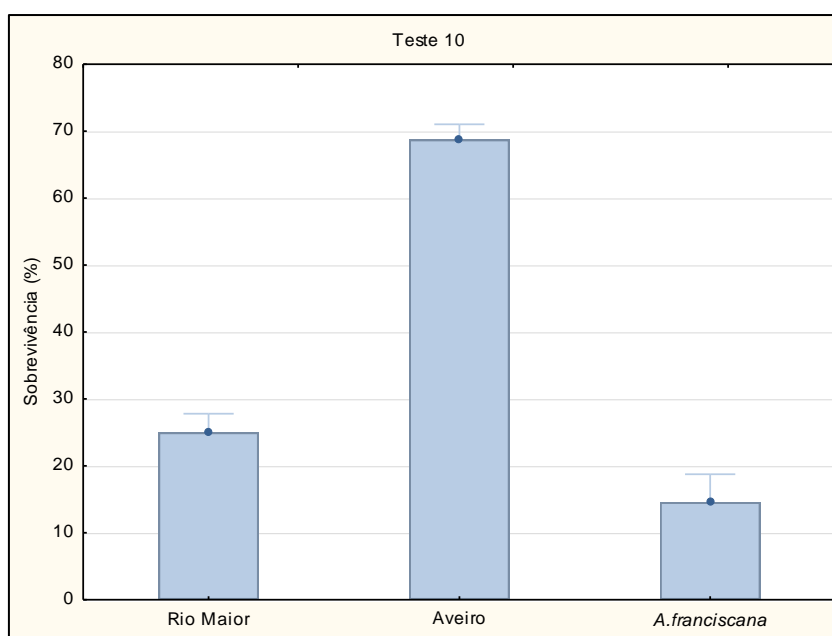


Figura 31 - Variação da influência do teste 10 nas populações testadas.

O teste 10 é o primeiro onde as 3 populações sobrevivem até ao 7º dia (figura 31).

Apesar de a concentração de magnésio no meio aumentar quase 3,5 vezes em relação ao teste 9, isso não beneficiou as populações autóctones, pois no caso da população de Aveiro a sobrevivência manteve-se, enquanto na população de Rio Maior diminuiu. Podemos então dizer que num meio onde a concentração de cálcio seja baixa, de forma a reduzir a hipótese de invasão por parte de *A. franciscana*, seria melhor tentar manter níveis de magnésio relativamente baixos, na ordem dos 450mg/l. No teste 12 (figura 32), apesar do aumento da concentração de cálcio e da redução da concentração de magnésio, a sobrevivência da população de Aveiro manteve-se idêntica à do teste 10. Porém, a sobrevivência da população de Rio Maior diminuiu, sendo que a população de *A. franciscana*, apesar de sobreviver, podemos considerar uma sobrevivência residual, na ordem dos 5%.

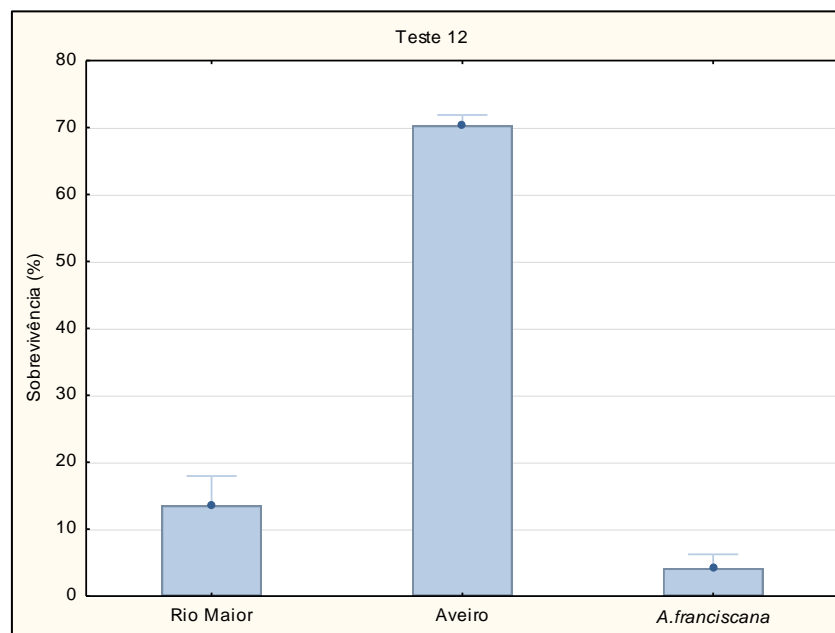


Figura 32 - Variação da influência do teste 12 nas populações testadas.

Relativamente ao teste 13 (figura 33), mais uma vez o aumento de magnésio proporcionou melhores resultados à população de Aveiro, contudo, prejudicou também as populações de Rio Maior e de *A. franciscana*.

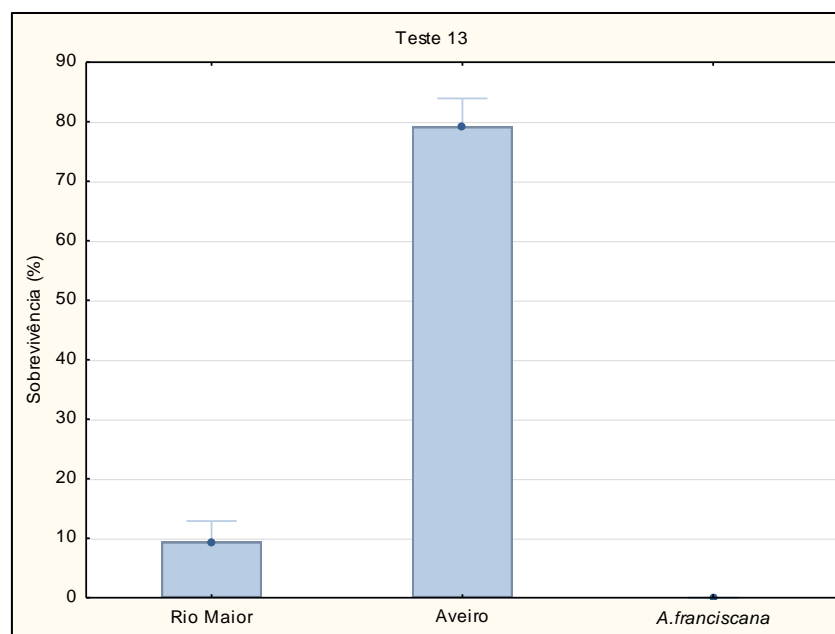


Figura 33 - Variação da influência do teste 13 nas populações testadas.

Em relação ao teste 14 (figura 34), podemos verificar que o aumento de magnésio beneficia mais uma vez a população de Aveiro, beneficiando, ainda que ligeiramente, a população de *A. franciscana*.

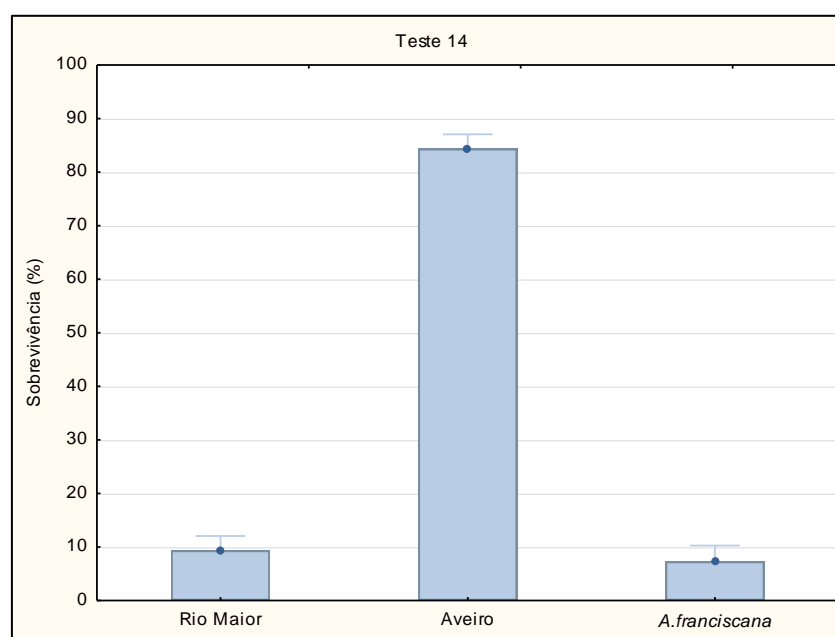


Figura 34 - Variação da influência do teste 14 nas populações testadas.

Aumentando a concentração de magnésio para os valores máximos, podemos conferir no teste 15 (figura 35) que mais uma vez, o nível máximo de magnésio no meio prejudica as populações autóctones beneficiando a população invasora.

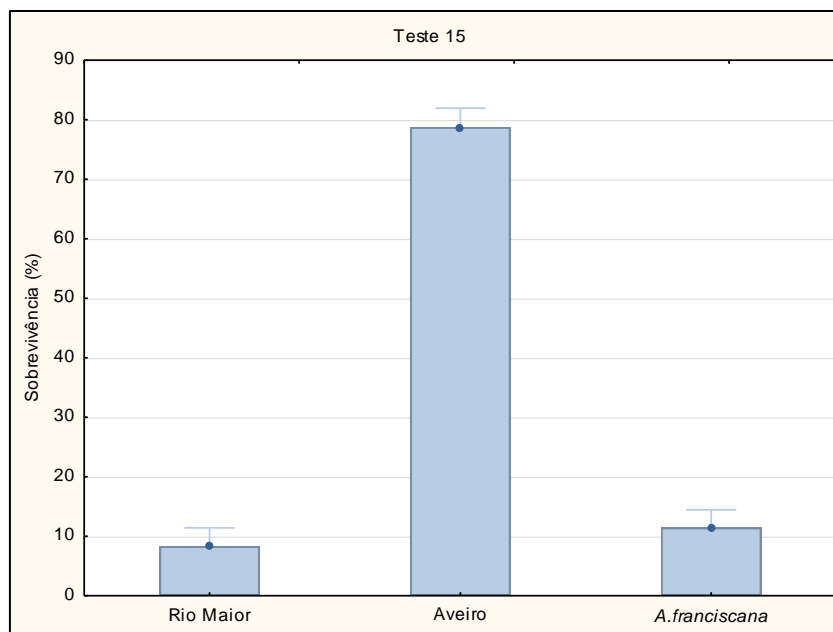


Figura 35 - Variação da influência do teste 15 nas populações testadas.

Quando a concentração de cálcio é máxima, apenas a população de Aveiro consegue percentagens de sobrevivência elevadas, mediante a existência de magnésio no meio. No teste 19 (figura 36) é possível constatar um dos melhores resultados de sobrevivência relativamente à população de Aveiro.

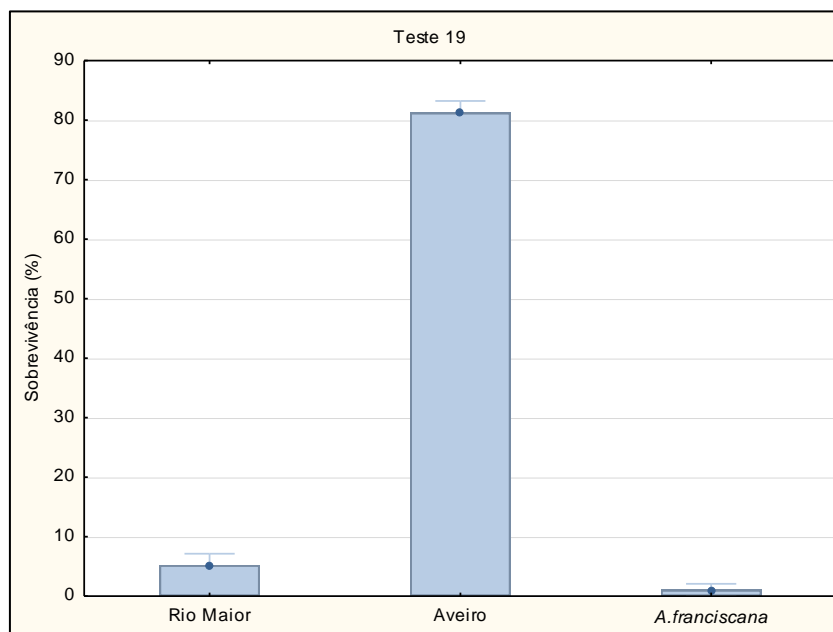


Figura 36 - Variação da influência do teste 19 nas populações testadas.

As populações de Rio Maior e de *A. franciscana* só conseguem sobreviver em meios ricos em cálcio, quando nestes meios a concentração de magnésio é relativamente alta ou máxima, no entanto, e como se pode ver no teste 20 (figura 37), quando as

duas concentrações são máximas, mais uma vez só a população de *A. franciscana* apresenta melhorias na sobrevivência, podendo-se então considerar, que mais uma vez, a concentração alta de magnésio torna-se prejudicial para as populações autóctones.

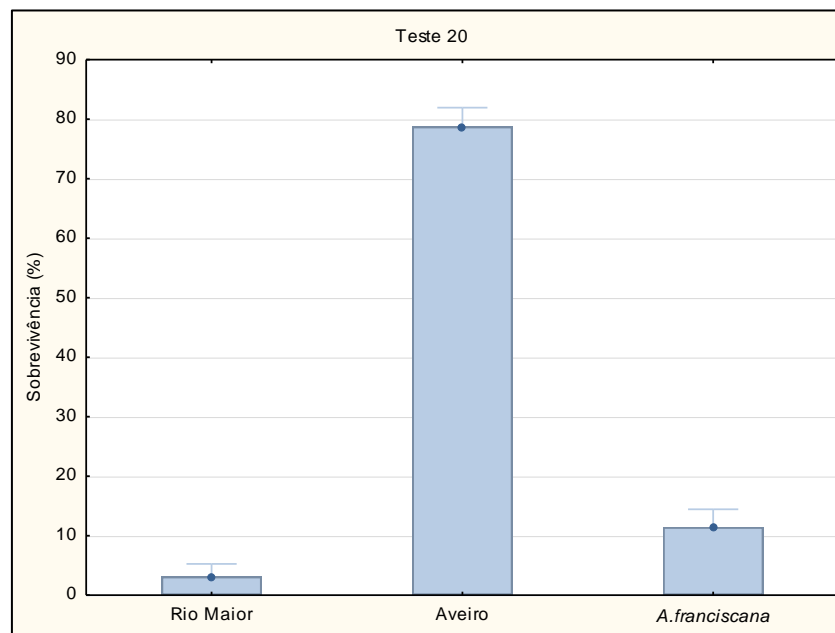


Figura 37 - Variação da influência do teste 20 nas populações testadas.

3.2.3. Estudo intrapopulacional da duração máxima atingida

A análise à duração máxima atingida foi efetuada para tentar perceber um pouco melhor os efeitos dos testes nas populações.

Foi, mais uma vez, efetuada uma ANOVA (tabela 12), que comprovou haver diferenças significativas.

Tabela 12 - Resultado da ANOVA (p) para as três populações testadas.

Variável	df Effect	df Error	p
Rio Maior	19	91	0,000000
Aveiro	19	93	0,000000
<i>A. franciscana</i>	19	94	0,000000

Os resultados dos testes Tukey, por serem muito extensos, foram colocados em anexo (Anexo I; Tabelas 14, 15 e 16). Os resultados não vão ser analisados seguindo estritamente a existência ou não de diferenças significativas.

3.2.3.1. *A.parthenogenetica* de Rio Maior

Analisando o gráfico (figura 38) podemos verificar que, de uma forma geral, o aumento da concentração do cálcio promoveu um aumento da longevidade da população. Podemos verificar que a maior longevidade foi atingida nos meios com menor concentração de cálcio, mas com concentração média ou elevada de magnésio. É possível também verificar que o aumento da concentração de cálcio no meio, permite que mais gamas de magnésio proporcionem uma longevidade maior. Em termos estatísticos, de uma forma geral, o resultado acompanha o que é possível observar no gráfico: há três grupos principais de testes que, independentemente, são significativamente diferentes de todos os outros testes. Há ainda outro teste que apresenta diferenças significativas para com todos os outros: o teste nº1, onde não há qualquer concentração de cálcio ou magnésio. Isto vem reforçar imensamente a ideia de que a população de *Artemia* de Rio Maior precisa destes iões para sobreviver.

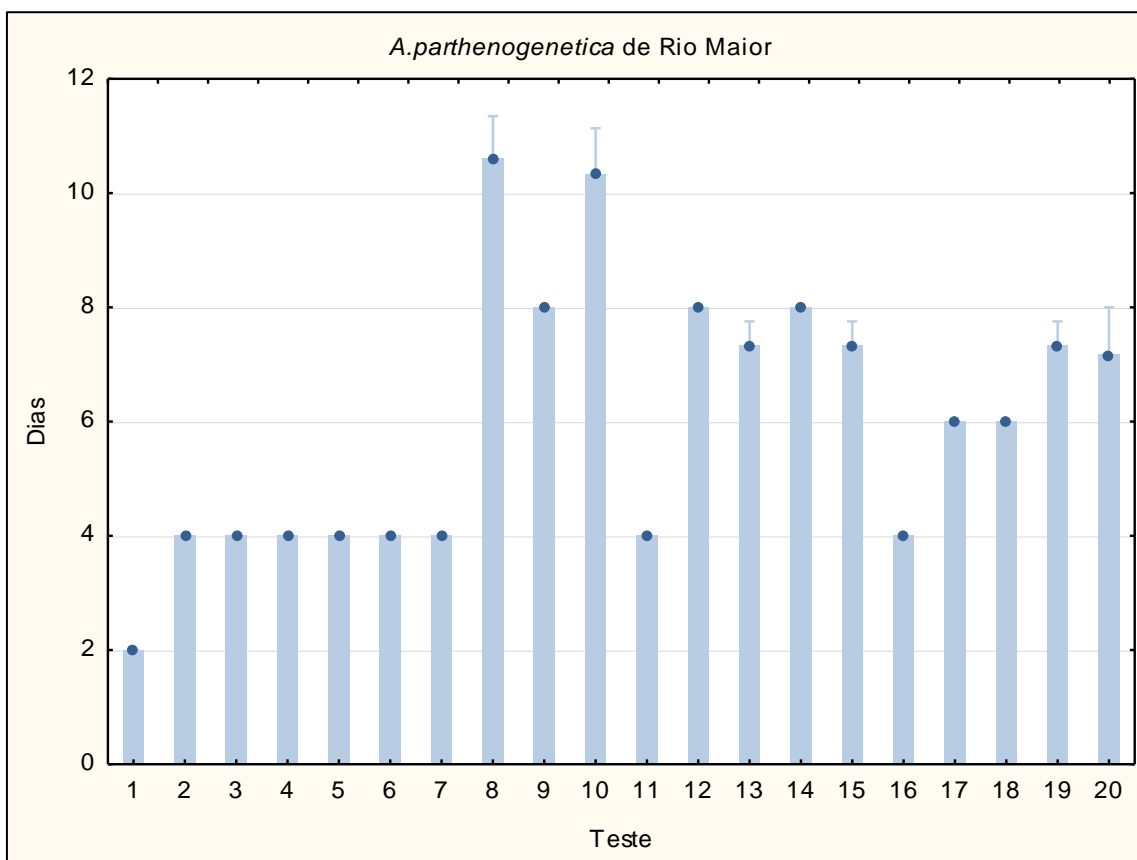


Figura 38 - Duração máxima atingida pela população de *A.parthenogenetica* de Rio Maior nos testes efetuados.

3.2.3.2. *A.parthenogenetica* de Aveiro

Nos testes efetuados com esta população (figura 39), é, tal como nos testes de percentagem de sobrevivência, perceptível a influência positiva que o aumento da concentração de magnésio tem na população. Tal como nos testes da população de Rio Maior, é possível notar a existência de três grupos principais, que, mais uma vez, diferem de forma significativa de todos os outros testes. No entanto, neste caso, há uma ligeira diferença: os testes dos três grupos não diferem entre si, sendo por isso os grupos bastante semelhantes. Esses três grupos correspondem às três concentrações de cálcio mais elevadas. É possível notar que neste tipo de análise, o aumento da concentração de magnésio até ao nível máximo não se torna prejudicial, antes pelo contrário, torna-se benéfico, pois a duração máxima foi sempre tanto mais longa quanto maior a concentração de magnésio. É possível notar, mais uma vez, que a completa ausência de magnésio e cálcio é extremamente prejudicial às populações, sendo a longevidade mínima nestas condições.

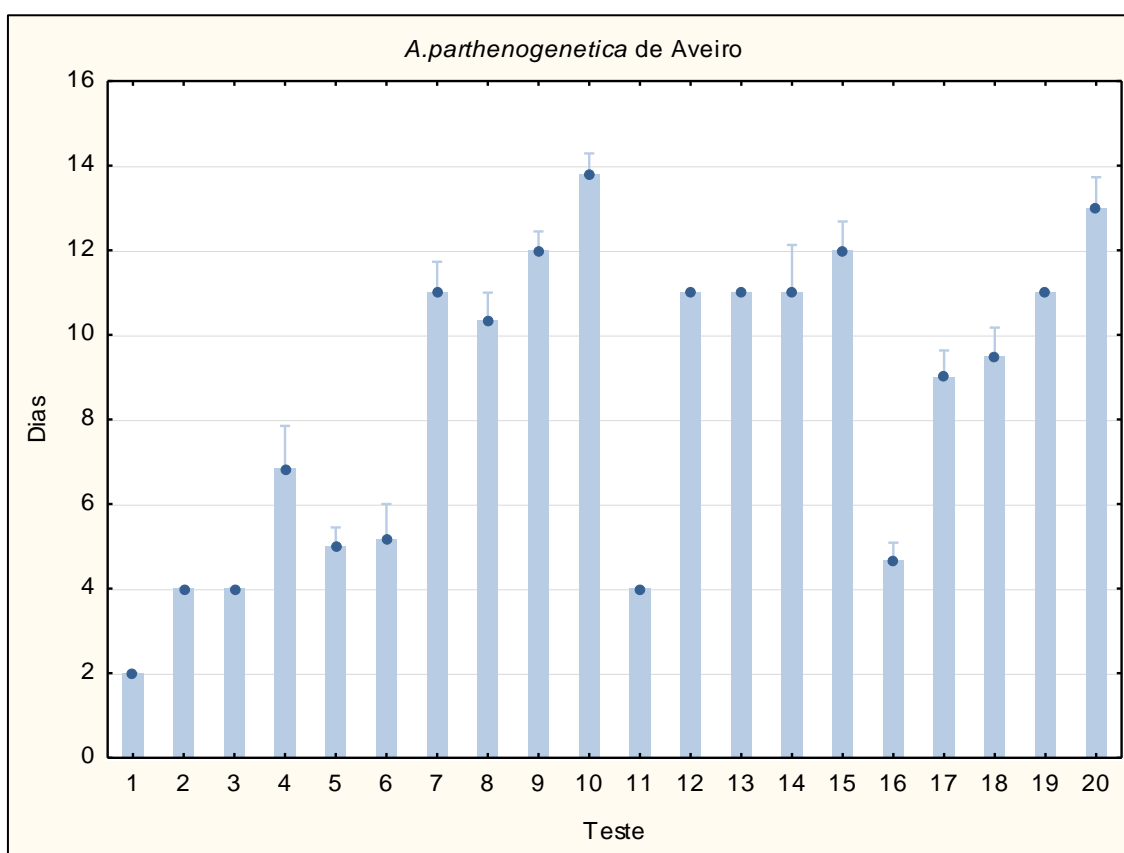


Figura 39 - Duração máxima atingida pela população de *A.parthenogenetica* de Aveiro nos testes efetuados.

3.2.3.3. *A. franciscana*

A população de *A. franciscana*, é, mais uma vez, a que apresenta piores resultados nos testes efetuados (figura 40).

Nesta análise é perceptível que o aumento de cálcio no meio só é benéfico em concentrações intermédias, prejudicando a longevidade da população quando tem valores muito baixos, ou relativamente altos. No entanto, isso é contrariado mediante a presença de magnésio na concentração máxima. Nesta análise, ficou ainda mais vincada a importância que uma elevada concentração de magnésio tem para esta população, pois os resultados com longevidade máxima foram conseguidos apenas nos testes onde a concentração de magnésio era máxima. É também perceptível a importância do magnésio e cálcio nos testes 1 e 2, pois nestes testes, a longevidade foi a mínima, demonstrando que a ausência ou presença de magnésio e cálcio em concentrações muito baixas é de todo prejudicial para a população.

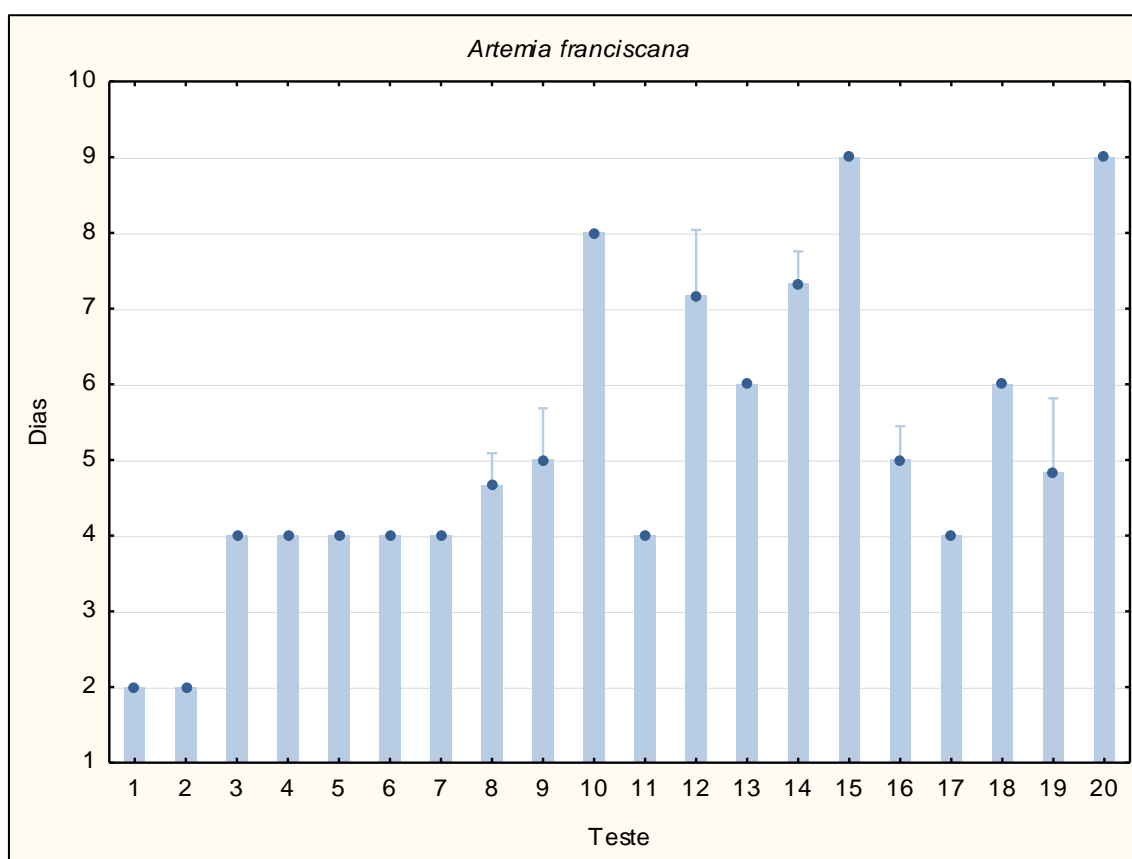


Figura 40 - Duração máxima atingida pela população de *A. franciscana* nos testes efetuados.

3.3. Discussão dos resultados

Nos testes efetuados tivemos problemas em termos da duração dos testes. Com condições semelhantes, Bowen *et al* (1988), conseguiram obter populações por ele testadas até à maturidade. O facto de nenhuma população ter atingido a maturidade leva a crer que tenha ocorrido algum problema em termos de execução do trabalho, nomeadamente na preparação dos meios, ou do alimento. No que toca à composição dos meios, uma vez que apenas foi possível garantir as concentrações corretas de alguns dos iões presentes na água, é colocada a hipótese de a falta de outros iões interferir com a sobrevivência das populações. No entanto, mediante o que foi observado durante o controlo das experiências, é provável que o alimento utilizado também tenha tido algum tipo de influência sobre a sobrevivência: aquando do controlo da sobrevivência, era possível notar que alguns náuplios ficavam presos sob uma camada de levedura presente no fundo dos poços. Isso ocorria porque os náuplios nadavam na zona mais profunda do poço, acabando às vezes por se colocarem por baixo da camada de levedura, não conseguindo depois soltar-se, acabando por morrer. Durante o controlo, sempre que ocorria uma situação dessas, procedia-se à tentativa de soltar o náuplio, utilizando uma micropipeta para o retirar do local. Também o facto de utilizar leveduras como alimento poderá ter contribuído para a elevada mortalidade: a presença de leveduras no meio acelera a deterioração da qualidade do meio. Apesar da possível influência destes problemas nos resultados obtidos, os testes estatísticos não deixam dúvida, mostrando que as diferenças observadas se deveram mesmo aos elementos testados.

A população de *A.parthenogenetica* de Rio Maior, nas condições testadas, nunca apresentou percentagens de sobrevivência muito elevadas, sendo que a percentagem mais elevada foi apenas cerca de 28%. As melhores percentagens de sobrevivência foram obtidas quando a concentração de cálcio era 50 mg/l, e a de magnésio era 450mg/l e 1300 mg/l. No entanto, e apesar disso, é possível notar que a população está habituada a níveis baixos e intermédios de cálcio, concordantes com os valores encontrados na salina. No que toca ao magnésio, apesar de a concentração mais alta encontrada na salina ter sido cerca de 400mg/l, é possível notar que concentrações de magnésio mais altas são também toleradas pela população, sendo também possível notar, que quando a concentração de magnésio sobe para 1300 mg/l, a percentagem de sobrevivência diminui, sucedendo que, para cada concentração de cálcio, o melhor resultado obtido foi sempre com uma concentração de magnésio de 450 mg/l, concentração essa também possível de encontrar na salina. No que toca à longevidade, é possível também notar uma influência positiva à medida que a

concentração de cálcio aumentava. A variação da concentração do magnésio, não terá muita influência na longevidade, apenas se notando uma leve influência quando a concentração de cálcio é a mais alta.

Em relação à população de *A.parthenogenetica* de Aveiro, verifica-se que as percentagens de sobrevivência mais consistentes e mais elevadas ocorrem quando a concentração de cálcio é intermédia (150 mg/l). No entanto, um aumento da concentração de cálcio, só é prejudicial se esta não for acompanhada por um aumento da concentração de magnésio. O aumento da concentração de magnésio é benéfica para a sobrevivência da população, mas só até certa concentração, pois, quando o magnésio atinge a concentração de 1300 mg/l, a sobrevivência diminui. Pelos resultados podemos observar que, para esta população, a concentração de magnésio ideal será de 450 mg/l. No que toca à longevidade máxima, é possível verificar que neste caso, o aumento da concentração de magnésio é sempre benéfico, sendo que o aumento da concentração de cálcio não tem grande influência no resultado. Estes resultados demonstram a enorme plasticidade que esta população tem. Como esta população vem de uma salina alimentada com água do mar, está sujeita às variações da composição iónica da água, que poderá oscilar muito mais que num local fechado, como é o caso das salinas de Rio Maior.

A população de *A.franciscana* é aquela que se apresenta como mais sensível aos valores de cálcio e magnésio testados. Pelos resultados obtidos, é possível notar que esta população necessita de concentrações de cálcio intermédias, e principalmente concentrações de magnésio mais altas. Em apenas 5 testes houve organismos sobreviventes ao 7º dia. Desses 5 testes, em 3, a concentração do cálcio é moderada (150 mg/l), sendo que em 3 testes, a concentração de magnésio é elevada (1300mg/l). Isto leva a crer que esta população em particular é bastante sensível à ausência de concentrações altas de magnésio no meio. No que toca à longevidade dos testes, é possível notar o mesmo padrão verificado na sobrevivência: melhores resultados quando a concentração de magnésio é máxima, ou quando a concentração de cálcio é intermédia.

Todas as populações apresentam mortalidade completa, normalmente em menos de 7 dias, quando o meio não tem cálcio e/ou magnésio.

Comparando as três populações, é possível verificar que a que apresenta maior plasticidade é a população de Aveiro, seguida da de Rio Maior, sendo a população de *A.franciscana* aquela que apresenta piores resultados.

De uma forma geral, é possível verificar que as populações de *Artemia* autóctones apresentam diferente tolerância à composição iónica do meio. É possível notar nessas populações a influência que as concentrações encontradas no meio natural tiveram

nos resultados finais. No entanto acreditamos que essa influência não é mais acentuada devido ao período de manutenção das populações de *Artemia* no laboratório, onde foram mantidas, ao longo do ano, em água do mar, podendo isso ter causado aclimação das populações autóctones em estudo.

Bowen *et al* (1988), testaram também a influência da composição iónica em várias populações de *Artemia franciscana*. No seu trabalho, verificaram que o aumento da concentração de cálcio no meio, seria sempre benéfica para a sobrevivência da população, obtendo percentagens de sobrevivência, nas cinco populações testadas, acima dos 60%. Contudo, nos seus trabalhos, ficou também demonstrado que a concentração de carbonato na água influencia a sobrevivência, nomeadamente em relação a baixas concentrações de magnésio e cálcio, que proporcionam melhores percentagens de sobrevivência quando o habitat das populações é rico em carbonato. Este trabalho entra em linha de concordância com o de Bowen *et al* (1988), em relação às concentrações de magnésio: quanto mais alta a concentração de magnésio, maior a percentagem de sobrevivência.

Conclusão

4. Conclusão

Os parâmetros físico-químicos da água estão de acordo com aquilo que era esperado: não apresentam grandes oscilações em termos de nutrientes, podendo as pequenas oscilações verificadas deverem-se a *inputs* pontuais provenientes das escorrências. Os valores dos iões metálicos estão também de acordo com o que foi dito na introdução: a concentração de magnésio e cálcio na água da salina interior de Rio Maior é inferior à concentração encontrada na água do mar.

Através do estudo da tolerância às diferentes composições iónicas, foi possível verificar que a concentração de magnésio no meio, por vezes poderá interferir com a normal adaptação dos organismos a certas concentrações de cálcio. Foi possível também verificar que quando a concentração de magnésio no meio é de 1300mg/l ou superior, têm um impacto negativo na sobrevivência das populações autóctones, favorecendo a espécie invasora.

Em termos de tolerância às diferentes composições iónicas, foi possível determinar que a *Artemia parthenogenetica* de Aveiro é muito mais resistente que a *Artemia parthenogenetica* de Rio Maior e que a espécie invasora, *Artemia franciscana*.

A espécie partenogenética de Rio Maior apresenta também maior tolerância que a espécie invasora a certas composições iónicas, nomeadamente composições iónicas próximas das encontradas na salina.

Tendo em conta tudo isto, poderemos dizer com alguma segurança que a composição iónica da salina de Rio Maior poderá efetivamente funcionar como barreira química contra a espécie invasora, uma vez que a espécie invasora não sobrevive nas concentrações de magnésio e cálcio encontradas na salina.

Em relação à salina de Aveiro, uma vez que não foi feito o controlo dos níveis de cálcio e magnésio ao longo do ano, não se pode chegar a uma conclusão tão concreta como no caso da salina de Rio Maior. A única conclusão que se pode retirar em relação a Aveiro, é que a população de *Artemia* originária dessas salinas apresenta uma enorme tolerância às variações da composição iónica do meio. Isso não funcionará como medida de defesa contra uma invasão, mas poderá sempre funcionar como medida de sobrevivência quando a composição iónica do meio sofre sucessivas alterações.

Os resultados deste trabalho são animadores no que toca à possível descoberta de uma barreira química contra invasões, no entanto, para que esses resultados sejam realmente credíveis, é necessário um estudo muito mais intensivo.

É necessário controlar de forma mais frequente e detalhada a composição iónica da água na salina de Rio Maior, bem como a distribuição espacial da população de *Artemia* em função dessa composição iónica. Além disso, é também necessário alargar o leque de concentrações testadas, pois não foi possível cobrir muitas gamas de concentrações, como é o caso do magnésio, onde a concentração mais alta (1300 mg/l), era quase três vezes mais alta que a concentração seguinte (450 mg/l).

Bibliografia

Bibliografia

- Abatzopoulos T.J.; Zhang, B. & Sorgeloos, P., 1998. International study on *Artemia*. LIX. *Artemia tibetiana* preliminary characterization of a new *Artemia* species found in Tibet (People's republic of China). *International Journal of Salt Lake Research* **7**: 41–44.
- Amat, F., 1985. Biología de *Artemia*. Informes *Técnicos del Instituto Investigaciones Pesqueras* **126-127**: 3-60.
- Amat, F.; Cohen, R.G.; Hontoria, F. & Navarro, C., 2004. Further evidence and characterization of *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906) populations in Argentina. *Journal of Biogeography*, **31**: 1735-1749.
- Amat, F.; Hontoria, F.; Navarro, J.C.; Vieira, N. & Mura, G., 2007. Biodiversity loss in the genus *Artemia* in the Western Mediterranean Region. *Limnetica*, **26 (2)**: 387-404.
- Amat, F.; Hontoria, F.; Ruiz, O.; Green, A.J.; Sánchez, M.I.; Figuerola, J. & Hortas, F., 2005. The American brine shrimp as an exotic invasive species in the western Mediterranean. *Biological Invasions*, **7**: 37-47.
- Barata, C., Hontoria, F., & Browne, R., 1996. Competition between sexual and parthenogenetic *Artemia*: temperature and strain effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **196**: 313-328.
- Baseggio, G., 1973. The composition of Sea Water and Its Concentrates. *Fourth International Symposium on Salt – Northern Ohio Geological Society*.
- Bowen S.T.; Buoncristiani M.R. & Carl, J.R., 1988. *Artemia* habitats: Ion concentrations tolerated by one superspecies. *Hydrobiologia*, **158**: 201-214.
- Bowen, S.T.; Fogarino, E.A.; Hitchner, K.N.; Dana, G.L; Chow, V.H.S.; Buoncristiani M.R. & Carl, J.R., 1985. Ecological isolation in *Artemia*: Population differences in tolerance of anion concentrations. *Journal of Crustacean Biology*, **5 (1)**: 106-129.
-

Browne, R.A. & Wasigasekera, G., 2000. Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **244**: 29-44.

Cai, Y., 1989. A redescription of the brine shrimp (*Artemia sinica*). *The Wasmann Journal of Biology*, **47**: 105–110.

Calado, C. & Brandão, J.M., 2009. Salinas interiores de Portugal: o caso das marinhas de Rio Maior. *Geonovas*, **22**: 45-54.

Davis, J.S., 2000. Structure, function, and management of the biological system for seasonal solar saltworks. *Global Nest: the international journal*. **Vol. 2 (3)**: 217-226.

Davis, J.S. & Giordano, M., 1996. Biological and physical events involved in the origin, effects, and control of organic matter in solar saltworks. *International Journal of Salt Lake Research*. **4**: 335-347.

Ecosal-Atlantis, 2011. As Salinas de interior – um endemismo ibérico.

Fábregas, J.; Abalde, J.; Herrero, C.; Cabezas, B. & Veiga, M., 1984. Growth of the marine microalga *Tetrasehis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture*, **42**: 207-215.

Gajardo, G.M.; Sorgeloos, P. & Beardmore, J.A., 2006. Inland hypersaline lakes and the brine shrimp *Artemia* as simple models for biodiversity analysis at the population level. *Saline Systems*, **2**: 14.

Garcia, J.M., 2009. Implicaciones de la dispersión actual e histórica para la biología evolutiva y conservación de *Artemia* y otros invertebrados acuáticos con estadio de diapausa. Dissertação de doutoramento apresentada à Faculdade de Biologia da Universidade de Sevilla, 142 pp.

Goucha, G.; Maia, J.C. & Duarte, F., 1977. Marinhas de sal de Rio Maior, oito séculos de história: 1177-1997.

Gunther R.T., 1890. Crustacea. Em: Gunther RT (ed) *Contributions to the Natural History of Lake Urmí, N.W. Persia and its Neighbourhood*. *Journal of the Linnean Society (Zoology)* **27**: 394–398

Hontoria, F. & Amat, F. 1992. Morphological characterization of adult *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) from different geographical origin. Mediterranean populations. *Journal of Plankton Research*, **Vol. 14 (7)**: 949-959.

Irving, L., 1926. The precipitation of Calcium and Magnesium from Sea Water. *Journal of the Marine Biological Association*, **14(2)**.

Kellogg, V.A., 1906. A new *Artemia* and its life conditions. *Science*, **24**: 594–596.

Korovessis, N.A. & Lekkas, T.D., 2009. Solar Saltworks' Wetland Function. *Global Nest Journal*, **Vol. 11 (1)**: 49-57.

Kožíšek, F., 2003. Health significance of drinking water calcium and magnesium.

Leach, W.E., 1819. Entomostraca, *Dictionaire des Science Naturelles*, **14**: 524.

López, G.R.M., 2012. El recurso de *Artemia* de Argentina: Biodiversidad y uso en acuicultura. Dissertação de doutoramento apresentada à Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade de Valência, 257 pp.

Luquet, G. & Marin, F., 2004. Biomineralisations in crustaceans: storage strategies. *Comptes Rendus Palevol*, **3**: 515-534.

Neufeld, D.S. & Cameron, J.N., 1993. Transepithelial movement of calcium in crustaceans. *The Journal of Experimental Biology*, **184**: 1-16.

Nunes, B. S.; Carvalho, F. D.; Guilhermino, L. M.; Stappen, G. V., 2006. Use of genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution*, **144**: 453-462.

OhioEPA, 2005. Nitrate in Public Drinking Water.

Persoone, G. & Sorgeloos, P., 1980. General aspects of biogeography of *Artemia*. In: Persoone, G., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *The Brine Shrimp Artemia*, Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, 3. Universa Press, Wetteren, Belgium, pp. 3-24.

Piccinelli M & Prosdocimi T (1968) Descrizione tassonomica delle due species *Artemia salina* L. e *Artemia persimilis* n. sp. *Istituto Lombardo, Accademia di Scienze e Lettere, Rendiconti B* **102**: 170–179

Pinto, P.M.; Bio, A.; Hontoria, F.; Almeida, V. & Vieira, N., 2013. Portuguese native *Artemia parthenogenetica* and *Artemia franciscana* survival under different abiotic conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. **440**: 81-89.

Rodrigues, C.M., Bio, A., Amat, F.D., Monteiro, N.M. & Vieira, N.M., 2012. Surviving an Invasion: Characterization of One of the Last Refugia for *Artemia* Diploid Parthenogenetic Strains. *Wetlands*, **32(6)**: 1079-1090.

Silva, N., 1988. As Salinas de Rio Maior.

Soundarapandian, P. & Saravanakumar, G., 2009. Effect of Different Salinities on the Survival and Growth of *Artemia* Spp. *Current Research Journal of Biological Sciences*, **2**: 20-22.

Trüper, H.G. & Galinski, E.A., 1986. Concentrated brines as habitats for microorganisms. *Experientia*, **42**.

Van Stappen, G., 2002. Chapter IV. Zoogeography, em: Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg J.S., Sorgeloos, P. (Eds.), *Artemia* basic and applied biology. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 171-224.

Vieira, M., 1989. Contribuição para o conhecimento da biologia da *Artemia* sp. proveniente das salinas de Aveiro. Sua importância em aquacultura e na dinâmica daquele ecossistema. Dissertação de doutoramento apresentada à Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Departamento de Zoologia e Antropologia.

Wachter, B.D.; Abbeele, J.V.D. & Wolf, G., 1994. Effects of oxygen and salt on haemolymph oxygen binding in the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Marine Biology*, **118**: 263-269.

Walmsley, J.G., 1999. The ecological importance of Mediterranean salinas. *Proceedings of the Post Conference Symposium "SALTWORKS": Preserving Saline Coastal Ecosystems-Global NEST Samos, 1999.*, 81-95.

Wheatly M.G., Zanotto, F.P. & Hubbard, M.G., 2002. Calcium homeostasis in crustaceans: subcellular Ca dynamics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **132**: 163-178.

Referências bibliográficas eletrónicas consultadas:

Ecosal Atlantis

<http://ecosal-Atlantis.ua.pt/> (Acedido em Agosto, 2013)

EPA – Environmental Protection Agency

<http://www.epa.gov/agriculture/ag101/impactammonia.html> (Acedido em Setembro, 2013)

http://www.epa.gov/caddis/ssr_amm_int.html (Acedido em Setembro, 2013)

<http://water.epa.gov/type/rsl/monitoring/vms52.cfm> (Acedido em Setembro, 2013)

<http://water.epa.gov/type/rsl/monitoring/vms54.cfm> (Acedido em Setembro, 2013)

<http://water.epa.gov/type/rsl/monitoring/vms56.cfm> (Acedido em Setembro, 2013)

<http://water.epa.gov/type/rsl/monitoring/vms57.cfm> (Acedido em Setembro, 2013)

<http://water.epa.gov/type/rsl/monitoring/vms58.cfm> (Acedido em Setembro, 2013)

<http://water.epa.gov/type/rsl/monitoring/vms510.cfm> (Acedido em Setembro, 2013)

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations.

<http://www.fao.org/docrep/003/w3732e/w3732e0m.htm> (Acedido em Agosto, 2013)

NOAA – National Oceanic and Atmospheric Administration

http://oceanservice.noaa.gov/education/kits/estuaries/media/supp_estuar10d_dissolved_ox.html (Acedido em Setembro, 2013)

Vernier – Vernier Software & Technology

http://www2.vernier.com/sample_labs/WQV-13-COMP-calcium_water_hardness.pdf
(Acedido em Setembro, 2013)

Anexo I

Tabela 13 - Resultados dos testes Tukey (p) evidenciando, em função dos testes, entre quais populações havia percentagens de sobrevivência estatisticamente diferentes.

Teste 4				Teste 14			
Variáveis	Rio Maior	Aveiro	Franciscana	Variáveis	Rio Maior	Aveiro	Franciscana
Rio Maior		0,038318	1,000000	Rio Maior		0,000178	0,858287
Aveiro	0,038318		0,038318	Aveiro	0,000178		0,000178
Franciscana	1,000000	0,038318		Franciscana	0,858287	0,000178	
Teste 7				Teste 15			
Variáveis	Rio Maior	Aveiro	Franciscana	Variáveis	Rio Maior	Aveiro	Franciscana
Rio Maior		0,000184	1,000000	Rio Maior		0,000181	0,746600
Aveiro	0,000184		0,000182	Aveiro	0,000181		0,000181
Franciscana	1,000000	0,000182		Franciscana	0,746600	0,000181	
Teste 8				Teste 17			
Variáveis	Rio Maior	Aveiro	Franciscana	Variáveis	Rio Maior	Aveiro	Franciscana
Rio Maior		0,000185	0,207038	Rio Maior		0,000181	1,000000
Aveiro	0,000185		0,000181	Aveiro	0,000181		0,000181
Franciscana	0,207038	0,000181		Franciscana	1,000000	0,000181	
Teste 9				Teste 18			
Variáveis	Rio Maior	Aveiro	Franciscana	Variáveis	Rio Maior	Aveiro	Franciscana
Rio Maior		0,000198	0,002370	Rio Maior		0,000181	0,107393
Aveiro	0,000198		0,000181	Aveiro	0,000181		0,000181
Franciscana	0,002370	0,000181		Franciscana	0,107393	0,000181	
Teste 10				Teste 19			
Variáveis	Rio Maior	Aveiro	Franciscana	Variáveis	Rio Maior	Aveiro	Franciscana
Rio Maior		0,000181	0,118608	Rio Maior		0,000181	0,200822
Aveiro	0,000181		0,000181	Aveiro	0,000181		0,000181
Franciscana	0,118608	0,000181		Franciscana	0,200822	0,000181	
Teste 12				Teste 20			
Variáveis	Rio Maior	Aveiro	Franciscana	Variáveis	Rio Maior	Aveiro	Franciscana
Rio Maior		0,000186	0,117458	Rio Maior		0,000178	1,000000
Aveiro	0,000186		0,000186	Aveiro	0,000178		0,000178
Franciscana	0,117458	0,000186		Franciscana	1,000000	0,000178	
Teste 13							
Variáveis	Rio Maior	Aveiro	Franciscana				
Rio Maior		0,000178	0,161322				
Aveiro	0,000178		0,000178				
Franciscana	0,161322	0,000178					

Tabela 14 - Resultado do teste Tukey (p) evidenciando, para a população de Rio Maior, quais testes influenciavam de forma significativa a duração total de vida.

Teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1		0,0466	0,0466	0,0466	0,0466	0,0466	0,0466	0,0002	0,0002	0,0002	0,0466	0,0002	0,0002	0,0002	0,0466	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
2	0,0466		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0466	0,0158	0,0002	0,0002
3	0,0466	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0466	0,0158	0,0002	0,0002
4	0,0466	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	1,0000	0,0466	0,0158	0,0002	0,0002
5	0,0466	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	1,0000	0,0466	0,0158	0,0002	0,0002
6	0,0466	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	1,0000	0,0466	0,0158	0,0002	0,0002
7	0,0466	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	1,0000	0,0466	0,0158	0,0002	0,0002
8	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002		0,0012	1,0000	0,0002	0,0069	0,0002	0,0012	0,0002	0,0002	0,0466	0,0158	0,0002	0,0002
9	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0012		0,0066	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0466	0,0158	0,0002	0,0002
10	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0066		0,0002	0,0289	0,0002	0,0066	0,0002	0,0002	0,0466	0,0158	0,0002	0,0002
11	0,0466	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002		0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	1,0000	0,0466	0,0158	0,0002	0,0002
12	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0069	1,0000	0,0289	0,0002		0,9999	1,0000	0,9999	0,0002	0,1327	0,9999	0,9999	0,9979
13	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,9995	0,0002	0,0002	0,9999		0,9995	1,0000	0,0002	0,6236	1,0000	1,0000	1,0000
14	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0012	1,0000	0,0066	0,0002	1,0000	0,9995		0,9995	0,0002	0,0466	0,9995	0,9995	0,9918
15	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,9995	0,0002	0,0002	0,9999	1,0000	0,9995		0,0002	0,6236	1,0000	1,0000	1,0000
16	0,0466	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002		0,0466	0,4528	0,4528	0,6962
17	0,0002	0,0466	0,0466	0,0466	0,0466	0,0466	0,0466	0,0002	0,0466	0,0002	0,0466	0,1327	0,6236	0,0466	0,6236	0,0466		1,0000	0,6236	0,8248
18	0,0002	0,0158	0,0158	0,0158	0,0158	0,0158	0,0466	0,0002	0,0466	0,0002	0,0158	0,1327	0,4528	0,0466	0,4528	0,0466	1,0000		0,4528	0,6962
19	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,9995	0,0002	0,0002	0,9999	1,0000	0,9995	1,0000	0,0002	0,6236	0,4528		1,0000
20	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,9918	0,0002	0,0002	0,9979	1,0000	0,9918	1,0000	0,0002	0,8248	0,6962	1,0000	

Tabela 15 - Resultado do teste Tukey (p) evidenciando, para a população de Aveiro, quais testes influenciavam de forma significativa a duração total de vida.

Teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1		0,8077	0,8077	0,0003	0,1407	0,0886	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,8077	0,0002	0,0002	0,0002	0,3106	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
2	0,8077		1,0000	0,1060	0,9997	0,9975	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
3	0,8077	1,0000		0,1060	0,9997	0,9975	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
4	0,0003	0,1060	0,1060		0,8024	0,9001	0,0007	0,0098	0,0002	0,0002	0,2140	0,0028	0,0144	0,0007	0,5273	0,5273	0,1725	0,0028	0,0028	0,0002
5	0,1407	0,9997	0,9997	0,8024		1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,9999	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0013	0,0003	0,0003	0,0002	0,0002
6	0,0886	0,9975	0,9975	0,9001	1,0000		0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,9992	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0025	0,0004	0,0004	0,0002	0,0002
7	0,0002	0,0002	0,0002	0,0007	0,0002	0,0002		1,0000	0,9997	0,2314	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,9997	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
8	0,0002	0,0002	0,0002	0,0098	0,0002	0,0002	1,0000		0,9001	0,9108	0,0002	0,9999	0,0002	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
9	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,9997	0,9001		0,9108	0,0002	0,9999	0,0002	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
10	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,2314	0,0350	0,9108		0,0002	0,2314	0,4250	0,2314	0,9108	0,0002	0,0003	0,0017	0,2314	1,0000
11	0,8077	1,0000	1,0000	0,2140	0,9999	0,9992	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002		0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
12	0,0002	0,0002	0,0002	0,0028	0,0002	0,0002	1,0000	1,0000	0,9999	0,2314	0,0002		1,0000	1,0000	0,9999	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
13	0,0002	0,0002	0,0002	0,0144	0,0002	0,0002	1,0000	1,0000	1,0000	0,4250	0,0002	1,0000		1,0000	1,0000	0,0002	0,9152	0,9954	1,0000	0,9152
14	0,0002	0,0002	0,0002	0,0007	0,0002	0,0002	1,0000	1,0000	0,9997	0,2314	0,0002	1,0000	1,0000		0,9997	0,0002	0,6725	0,9597	1,0000	0,6725
15	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,9997	0,9001	1,0000	0,9108	0,0002	0,9999	1,0000	0,9997		0,0002	0,0620	0,2661	0,9999	0,9997
16	0,3106	1,0000	1,0000	0,5273	1,0000	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	1,0000	0,0002	0,0002	0,0002			0,0004	1,0000	0,8077	0,0002
17	0,0002	0,0002	0,0002	0,5273	0,0013	0,0025	0,6725	0,9878	0,0620	0,0003	0,0002	0,8077	0,9152	0,6725	0,0620				0,9837	0,0013
18	0,0002	0,0002	0,0002	0,1725	0,0003	0,0004	0,9597	1,0000	0,2661	0,0017	0,0002	0,9837	0,9954	0,9597	0,2661	0,0002	1,0000		0,9837	0,0098
19	0,0002	0,0002	0,0002	0,0028	0,0002	0,0002	1,0000	1,0000	0,9999	0,2314	0,0002	1,0000	1,0000	1,0000	0,9999	0,0002	0,8077	0,9837		0,8077
20	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,6725	0,1725	0,9997	1,0000	0,0002	0,8077	0,9152	0,6725	0,9997	0,0002	0,0013	0,0098	0,8077	

Tabela 16 - Resultado do teste Tukey (p) evidenciando, para a população de *Artemia franciscana*, quais testes influenciavam de forma significativa a duração total de vida.

Teste	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1		1,0000	0,0427	0,0427	0,0427	0,0427	0,0427	0,0007	0,0002	0,0002	0,0427	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0427	0,0002	0,0003	0,0002
2	1,0000		0,0427	0,0427	0,0427	0,0427	0,0427	0,0007	0,0002	0,0002	0,0427	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0427	0,0002	0,0003	0,0002
3	0,0427	0,0427			1,0000	1,0000	1,0000	0,9995	0,9445	0,0002	1,0000	0,0002	0,1047	0,0002	0,0002	0,9445	1,0000	0,1047	0,9912	0,0002
4	0,0427	0,0427	1,0000		1,0000	1,0000	1,0000	0,9995	0,9445	0,0002	1,0000	0,0002	0,1047	0,0002	0,0002	0,9445	1,0000	0,1047	0,9912	0,0002
5	0,0427	0,0427	1,0000	1,0000		1,0000	1,0000	0,9995	0,9445	0,0002	1,0000	0,0002	0,1047	0,0002	0,0002	0,9445	1,0000	0,1047	0,9912	0,0002
6	0,0427	0,0427	1,0000	1,0000	1,0000		1,0000	0,9995	0,9445	0,0002	1,0000	0,0002	0,1047	0,0002	0,0002	0,9445	1,0000	0,1047	0,9912	0,0002
7	0,0427	0,0427	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		0,9995	0,9445	0,0002	1,0000	0,0002	0,1047	0,0002	0,0002	0,9445	1,0000	0,1047	0,9912	0,0002
8	0,0007	0,0007	0,9995	0,9995	0,9995	0,9995	0,9995		1,0000	0,0005	0,9995	0,0020	0,7604	0,0007	0,0002	1,0000	0,9995	0,7604	1,0000	0,0002
9	0,0002	0,0002	0,9445	0,9445	0,9445	0,9445	0,9445	1,0000		0,0028	0,9445	0,0164	0,9766	0,0058	0,0002	1,0000	0,9445	0,9766	1,0000	0,0002
10	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0005	0,0028		0,0002	0,9993	0,2425	1,0000	0,9930	0,0028	0,0002	0,2425	0,0012	0,9930
11	0,0427	0,0427	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9995	0,9445	0,0002	0,0002		0,0002	0,1047	0,0002	0,0002	0,9445	0,0164	0,9057	0,9057	0,0002
12	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0020	0,0164	0,9993	0,0002		0,9057	1,0000	0,2062	0,0164	0,0002	0,9057	0,9057	0,0002
13	0,0002	0,0002	0,1047	0,1047	0,1047	0,1047	0,1047	0,7604	0,9766	0,2425	0,1047	0,9057		0,7604	0,0005	0,9766	0,1047	1,0000	0,9057	0,0005
14	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0007	0,0058	1,0000	0,0002	1,0000	0,7604		0,3626	0,0058	0,0002	0,7604	0,0020	0,3626
15	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,9930	0,0002	0,2062	0,0005	0,3626		0,0002	0,0002	0,0005	0,0002	1,0000
16	0,0002	0,0002	0,9445	0,9445	0,9445	0,9445	0,9445	1,0000	1,0000	0,0028	0,9445	0,0164	0,9766	0,0058	0,0002		0,9445	0,9766	1,0000	0,0002
17	0,0427	0,0427	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9995	0,9445	0,0002	1,0000	0,0002	0,1047	0,0002	0,0002	0,9445		0,1047	0,9912	0,0002
18	0,0002	0,0002	0,1047	0,1047	0,1047	0,1047	0,1047	0,7604	0,9766	0,2425	0,1047	0,9057	1,0000	0,7604	0,0005	0,9766	0,1047		0,9057	0,0005
19	0,0003	0,0003	0,9912	0,9912	0,9912	0,9912	0,9912	1,0000	1,0000	0,0012	0,9912	0,0058	0,9057	0,0020	0,0002	1,0000	0,9912	0,9057		0,0002
20	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,9930	0,0002	0,2062	0,0005	0,3626	1,0000	0,0002	0,0002	0,0005	0,0002	